

**Untersuchungen zur Eignung retroviraler Vektoren
für die Simulation eines pathologischen Frühstadiums
der Diabetischen Retinopathie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von

Patrick Wagner

aus Friedberg/Hessen

Giessen 2005

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik III

Direktor: Prof. Dr. R. Bretzel

Universitätsklinikum Giessen und Marburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Peter Hammes

2. Gutachter: Prof. Dr. Sima Pavlovic

Tag der Disputation: 09.12.2005

1	Einleitung	1
1.1	Die Retina	1
1.2	Arterien, Venen und Kapillaren	3
1.3	Hyperglykämische Mikroangiopathie: Die Diabetische Retinopathie	6
1.3.1	Pathophysiologie und Klinik der Diabetischen Retinopathie	6
1.3.2	Pathogenese der Gefäßschädigung durch Hyperglykämie	8
1.4	Endothelzellassoziierte Rezeptortyrosinkinasen und Wachstumsfaktoren	11
1.4.1	Tie Rezeptortyrosinkinasen	12
1.4.2	Die Angiopoietine	14
1.4.3	VEGF bindende Rezeptortyrosinkinasen	17
1.5	Retrovirale Expressionsvektoren	18
1.5.1	Retroviren	18
1.5.2	Retroviren als Expressionsvektoren	19
1.5.3	Die Verpackungszelllinie	21
1.6	Die Ratte als molekularbiologisches Modell	22
1.7	Ziel dieser Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Geräte und Chemikalien	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Chemikalien, Enzyme und Lösungen	25
2.1.4	Eingesetzte Primer und Plasmide	26
2.2	Präparation der Versuchstiere	27
2.2.1	Intravitreale Injektion von retroviralen Vektoren	27
2.2.2	Entnahme und Präparation der Netzhaut	27
2.2.3	Enzymatische Netzhaut-Digestion	29
2.2.4	PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)	29
2.2.5	PLAP-Färbung	30
2.2.6	β -Galaktosidase Färbung der Netzhaut von „PlacZ-Mäusen“	31
2.3	Bearbeitung von Nukleinsäuren	32
2.3.1	Der retrovirale Expressionsvektor „pLXSN“	32
2.3.2	Klonierung von retroviralen Vektoren	34
2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.3.4	Gelelektrophoretische Größenfraktionierung von DNA-Fragmenten	35
2.3.5	Aufreinigung von DNA	36
2.3.5.1	Elution und Reinigung von DNA aus Gelen	36
2.3.5.2	Kieselgel-Adsorbtionschromatographie	36
2.3.5.3	Anionen-Austauschchromatographie	37
2.3.5.4	Alkoholfällung	37
2.3.6	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	37
2.3.6.1	Präparation von Plasmid-DNA zu analytischen Zweck	38
2.3.6.1	Amplifizierung von Plasmid-DNA	38
2.3.7	Enzymatische Modifikation von DNA	38
2.3.7.1	Analytischer und präparativer Restriktionsverdau	38

2.3.7.2	Ligation von DNA	39
2.3.8	Quantifizierung von Nukleinsäuren	39
2.3.9	DNA-Sequenzierung	40
2.4	Zellkultur	40
2.4.1	Lösungen , Medien und verwendete Zelllinien	40
2.4.2	Die Verpackungszelllinie „GP+E86“	41
2.4.3	Haltung und Vermehrung von eukaryotischen Zellen	41
2.4.4	Lagerung von eukaryontischen Zellen	41
2.4.5	Stabile Transfektions mittels Calciumphosphat-Kopräzipitation	42
2.4.6	Isolierung von transfizierten Verpackungszell-Klonen	43
2.4.7	Bestimmung des Virustiters	43
2.4.8	Konzentration des Virusüberstands durch Filtration	45
2.5	Bakterienkultur	45
2.5.1	Lösungen, Medien und verwendete Zelllinien	45
2.5.2	Transformation KCM-kompetenter Bakterien	45
2.5.3	Herstellung KCM-kompetenter Bakterien	46
2.5.4	Lagerung und Vermehrung	46
2.6	Immunologischer Proteinnachweis (Immunoblot / Western Blot)	47
2.6.1	Gewinnung von Proteinextrakten (Zellyse)	47
2.6.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	48
2.6.3	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	49
2.6.4	Immunologischer Proteinnachweis	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Erzeugung von retroviralen Expressionsvektoren.	51
3.1.1	Klonierung von retroviralen Expressionsvektoren.	51
3.1.2	Isolierung von Verpackungszell-Klonen mit hoher Virusproduktion.	52
3.2	Infektiösitätsnachweis der verwendeten retroviralen Konstrukte.	53
3.2.1	PLAP-Färbung von Fibroblasten nach Infektion mit LXS _N /PLAP <i>in vitro</i>	53
3.2.2	PLAP-Färbung der Netzhaut nach Infektion mit LXS _N /PLAP <i>in vivo</i> .	54
3.3	Einschleusung von Angiopoietin-2 in Wirtszellen mit Hilfe retroviraler Expressionsvektoren	55
3.3.1	Western-Blot zum Nachweis der Expression von Angiopoietin-2 in LXS _N /hAng-2-virus-transformierten Fibroblasten.	55
3.3.2	Enzymatische Netzhautdigestion nach Injektion von LXS _N /Ang-2 in die Ratte.	56
3.3.3	LacZ-Färbung der Retina nach Injektion von LXS _N /Ang-2 in PlacZ-Mäuse.	58
4	Diskussion	60
4.1	Synthese und Charakterisierung rekombinanter retroviraler Vektor-Plasmide	60
4.2	Erzeugung und Isolierung virusproduzierender Verpackungszellklone	61
4.3	Nachweis der Infektiösität rekombinanter Retroviren und erfolgreicher Transgenexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	62
4.4	Eignung retroviraler Vektoren zur Simulation eines frühen Stadiums der Diabetischen Retinopathie	64
4.5	Ausblick	67

5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang	83
7.1	Abkürzungen	83
7.2	Bildnachweis	84
7.3	Sequenz des retroviralen Expressionsvektors pLXSN	85
7.4	Lebenslauf	87
7.5	Danksagung	88
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	88

1 Einleitung

1.1 Die Retina

Die Netzhaut („Retina“) ist Bestandteil des Auges und dient zur optischen Wahrnehmung der Umgebung eines Organismus. Somit ist sie eines der wichtigsten sensorischen Gewebe und findet sich in den verschiedensten Formen und Spezialisierungen im Tierreich wieder.

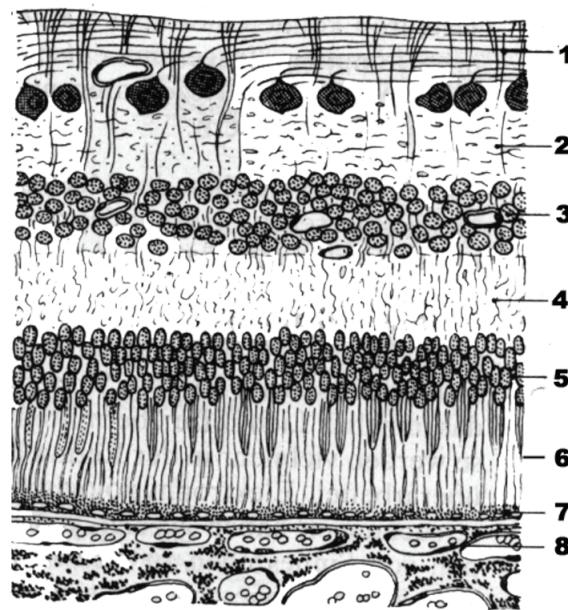


Abb. 1 Transversalschnitt durch die Netzhaut (Schema)

Schematischer Bau der Netzhaut: 1: Ganglienzellschicht, 2: innere plexiforme Schicht, 3: innere Körnerschicht, 4: äußere plexiforme Schicht, 5: äußere Körnerschicht, 6: Rezeptorzellschicht, 7: Pigmentepithel, 8: Aderhaut. (Aus Kahle, Leonhardt, Platzer: „dtv-Atlas der Anatomie“).

Die Netzhaut des Menschen ist besonders auf die Unterscheidung von Farben ausgelegt. Ein Verlust des Sehsinns, wie z. B. als Extremform der Diabetischen Retinopathie (s.u.), ist für den betroffenen Patienten mit einem hohen Leidensdruck verbunden. Der Augapfel (*Bulbus oculi*) besteht aus der Linse und dem Glaskörper (*Corpus vitreum*), der von drei Häuten umschlossen wird. Im vorderen Bereich sind dies u.a. Hornhaut (*Cornea*), Iris und *Corpus ciliare*. Der hintere Bereich besteht aus Lederhaut (*Sclera*), Aderhaut (*Choroidea*) und Netzhaut (*Retina*). Die Netzhaut gliedert sich in *Stratum pigmentosum* (Pigmentepithel), *Stratum neuroepitheliale* (Rezeptorzellschicht) und *Stratum nervosum* (plexiforme Schichten, Körnerschichten und Ganglienzellschicht). Während der Embryogenese stülpt sich das diencephale Augenbläschen ein und wird zum Augenbecher mit seinem inneren und äußeren

Blatt, aus dem sich das Pigmentepithel und die Retina entwickeln. Wegen dieser Inversion der Retina müssen die einfallenden Lichtquanten das gesamte *Stratum nervosum* durchtreten, bevor sie die eigentlichen Photorezeptoren erreichen. Die Plexiformen Schichten repräsentieren die Zellfortsätze der Neuronen, wohingegen die Körnerschichten die Perikaryen dieser Zellen darstellen. Neben den Neuronen, die zur Signalverarbeitung und Weiterleitung dienen (Stäbchen, Zapfen, Bipolarzellen, Horizontalzellen, amakrine Zellen und Ganglienzellen) gibt es noch die interplexiformen Zellen und die Müller Zellen. Dies sind Gliazellen, die sich durch die gesamte Netzhaut strecken und Stützfunktion haben.

Die Versorgung der Retina erfolgt durch zwei Gefäßsysteme. Der äußere Bereich der Netzhaut wird bis zur äußeren Begrenzung der inneren Körnerschicht durch Diffusion von einem Kapillarnetz der Choroidea (*Lamina choriocapillaris*) versorgt. Dieses Gefäßnetz speist sich zum einen aus den *Aa. Ciliares posteriores breves*, die aus der Tiefe der Aderhaut (*Choroidea*) entspringen, zum anderen aus rekurrierenden Gefäßästen der *Aa. Ciliares anteriores* sowie *Aa. ciliares posteriores longae* aus dem Bereich der *ora serrata*. Die Sauerstoffdiffusion erfolgt durch die Bruchsche Membran, welche die Choroideakapillaren von dem Pigmentepithel der Retina trennt und somit an der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke (Barriere zwischen systemischen Blutfluss und der Netzhaut) beteiligt ist.

Die inneren Schichten der Netzhaut erhalten ihre Blutversorgung aus insgesamt vier Hauptästen der *A. centralis retinae*, die zentral aus dem *N. opticus* austritt. Die größeren Gefäße liegen innerhalb der Ganglienzellschicht. Die Vaskularisierung der gesamten Netzhaut erfolgt durch Aussprossen von Endothelzellen entlang eines Astrozytennetzwerkes via Angiogenese [Gariano 2003, Fruttiger 2002]. Kleinere Gefäße sprießen in die Tiefe und bilden das mittlere (innere plexiforme Schicht) und das tiefe Kapillarbett (Übergang innere Körnerschicht zu äußerer plexiformen Schicht) zwischen Tag P8 (8. postnataler Tag) und P12. Der an der Vaskularisierung beteiligte Astrozytenverband exprimiert VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*, s. **1.4.3**). Dabei bildet die an der Spitze der „*sprouts*“ gelegene „*tipp cell*“ Filopodien aus, auf denen VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1) nachweisbar ist. Die Orientierung und Migration der *tipp cell* erfolgt mit Hilfe der Filopodien entlang eines VEGF-A Gradienten [Gerhardt et al 2003, Dorrell et al. 2002]. Die eigentliche Proliferationszone liegt hinter der *tipp cell* in Form der sogenannten „*stalk cell*“, welche durch die Proliferation auch zur Ausbildung des eigentlichen Gefäßlumens führt. In der Maus ist die Kapillarisierung mittels Angiogenese an Tag P18 endgültig abgeschlossen. Die ausgereiften Kapillaren bestehen aus einem einzelligen Endothelzellverband, der von Perizyten umgeben ist. Die Reifung der Netzhautgefäße geht von einem dichten embryonalen Gefäßplexus aus, der aus

Endothelzellverbänden besteht und bereits sehr früh fertiggestellt ist. Die Besiedelung des Kapillarnetzes mit Perizyten erfolgt nach Benjamin [Benjamin et al. 1998] zeitlich versetzt (primäre Aufzweigungen an Tag P10, sekundäre und tertiäre Aufzweigungen an Tag P18). Nach dieser Theorie wandern α -smooth-muscle-actin positive Zellen (Perizyten-Vorläuferzellen) in arterio-venöser Richtung entlang der Arteriolen auf die Kapillaren zu.

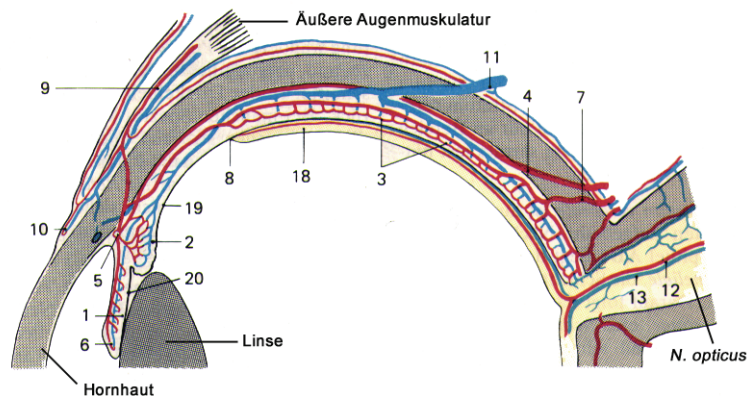


Abb. 2 Gefäßversorgung des Auges

Die Zeichnung zeigt die vaskuläre Versorgung des Auges. 1: Iris, 2: *Corpus ciliare*, 3: *Choroidea*, 4: *Aa. ciliares posteriores longae*, 5: *Circulus arteriosus iridis major*, 6: *Circulus arteriosus iridis minor*, 7: *Aa. ciliares posteriores breves*, 8: *Ora serrata*, 9: *Aa. ciliares anteriores*, 10: Randschlingen, 11: *Vv. vorticosae*, 12: *A. centralis retinae*, 13: *V. centralis retinae*. Hervorzuheben ist die *Arteria centralis retinae* (12), die aus dem Zentrum des *Nervus opticus* entspringt und die inneren Schichten der Netzhaut versorgt. Die Versorgung des äußeren Gewebes erfolgt durch Diffusion aus den *Aa. ciliares*. (Nach Kahle, Leonhardt, Platzer: „dtv-Atlas der Anatomie“).

In dem Zeitfenster, in dem das Gefäßnetz keinen Perizytenbesatz besitzt, wären die Kapillaren nach dieser Theorie für bestimmte Reize anfällig, nach späterer Auflagerung von Perizyten jedoch nicht mehr. So käme es nach Beginn verstärkter Gefäßdurchblutung in der Netzhaut zu physiologischer Hyperoxie, was zu einem Verschluss und einer Regression von Gefäßen führen würde. VEGF antagonisiere diesen Effekt und beschleunige die Perizyten-Rekrutierung, wirke somit protektiv auf das unreife Kapillarbett. Neuere Studien hingegen widerlegen diese Theorie und zeigen, dass sich Perizyten bereits auf den aktiv aussprossenden Gefäßen befinden und die Endothelzellen nicht erst sekundär von perivaskulären Zellen besiedelt werden [Gerhardt et al. 2003].

1.2 Arterien, Venen und Kapillaren

Ein geschlossenes kardiovaskuläres System dient neben der Sauerstoffversorgung auch dem Transport von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Hormonen. Bei den Säugern besitzen die Gefäße zusätzlich zu oben genannten Funktionen auch die Aufgabe der

Temperaturregulation und stellen einen nicht unwesentlichen Bestandteil des Immunsystems dar. Im Zentrum des kardiovaskulären Systems steht das Herz als Saug-Druck-Pumpe, das als ein unwillkürlich gesteuertes, autonomes Organ einen steten Blutfluß ermöglicht. Das Blutvolumen zirkuliert in zwei „parallel“ angelegten Kreisläufen, dem kleinen Lungenkreislauf, der der Sauerstoffanreicherung des Blutes dient, und dem großen Körperkreislauf. Der Blutfluß erfolgt innerhalb von Gefäßen, die sich in Arterien, Venen und Kapillaren einteilen lassen. Venen leiten Blut zum Herzen; Blut, das dem Herzen zugeleitet wird, ist ungeachtet seines Sauerstoffgehalts somit als venös zu bezeichnen, arterielles Blut fließt in Arterien vom Herzen weg in die Körperperipherie.

Größere Gefäße sind aus drei Schichten aufgebaut, nämlich der *Tunica intima* (einschichtiges Plattenepithel aus Endothelzellen), der *Tunica media* (glatte Muskelzellen und Bindegewebe) und der *Tunica adventitia*. Arterien besitzen im Vergleich zu Venen eine stärkere Muskelschicht; die Wandstärke der Venen ist eher gering und lässt auf ihre Funktion als Blutreservoir schließen. Die Kapillaren stehen als Ort des Stoffaustauschs in direktem Kontakt zum umgebenden Gewebe. Ihr Lumen wird von einer einlagigen Endothelzellschicht umkleidet, auf der perivaskuläre Zellen, sog. Perizyten, sitzen. Das Kapillarbett zeigt je nach Lokalisation und Funktion unterschiedliche Durchlässigkeit für Blutbestandteile. So ist die Blut-Hirn-Schranke eher undurchlässig, das gefensterte Endothel der Nierenglomerulie für Moleküle kleiner 70 kDa hingegen permeabel. Alle Gefäße sind von einer einschichtigen Endothelzelllage ausgekleidet. Endothelzellen haben im Organismus mannigfaltige Funktionen. So verhindern sie im gesunden Gefäß, daß es zu einer Gerinnung des Blutes kommt [Esmon und Owen 1981]. Bei der Verwundung eines Gefäßes und folgender Koagulation spielen Endothelzellen ebenfalls eine Rolle [Esmon 1993]. Auch Änderungen in der Hämodynamik können über Endothelzellen Einfluß auf den Spannungszustand der glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden haben [Cooke et al. 1991]. Das kardiovaskuläre System ist während der Embryonalentwicklung das erste sich entwickelnde Organsystem. Mesodermale Vorläuferzellen bilden Aggregate, die auch als Blutinseln bezeichnet werden. Aus den in der Peripherie gelegenen Zellen der Blutinseln entwickeln sich Angioblasten, im Zentrum gelegene Vorläuferzellen differenzieren sich zu embryonalen Blutzellen. Aus den Angioblasten entwickeln sich Endothelzellen. Die Fusion von Blutinseln resultiert in der Bildung erster primitiver Gefäße. Diese Bildung eines vorläufigen, primitiven Gefäßsystems aus *in situ* differenzierenden Angioblasten nennt man Vaskulogenese [Risau et al. 1991; von Schulte 1914]. Ihr gegenüber steht die Angiogenese. Hierbei erfolgt die Gefäßneubildung ausschließlich aus bereits existierenden Gefäßen [Hertig 1935]. Es lassen sich zwei Arten der

Angiogenese unterscheiden. Bei dem einen Typ sprießen aus einem vorhandenen Gefäß neue Gefäße in das umgebende Gewebe aus (*sprouting*) [Risau 1997]. Die zweite Art der Gefäßneubildung erfolgt durch Intussuszeption bereits bestehender Gefäße. Hierbei spaltet sich ein Gefäß durch Invagination von Perizyten, glatten Muskelzellen und Bindegewebe in zwei Tochtergefäße auf [Burri et al. 1990, Patan et al. 1996]. Im Rahmen der Angiogenese kommt es zu Interaktionen zwischen Endothelzellen und den umgebenden Perizyten. Die entsprechenden Vorgänge werden u.a. durch die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 und ihre Liganden, die Angiopoietine vermittelt. Im adulten Organismus erfolgt die Gefäßneubildung vorwiegend über Angiogenese. Ausgereifte, stabile Gefäße zeichnen sich durch Perizytenbesatz aus. Perizyten sind mesenchymale, kontraktile Zellen, die mit ihren langen pseudopodienartigen Zellfortsätzen die Endothelzellen umschlingen und je nach Gewebe sehr heterogen sind. So existiert für diese Zellart eine Fülle von Synonymen, wie z.B. Ito-Zellen, Mesangium-Zelle oder Myofibroblast. Der zelluläre Ursprung von Perizyten ist unklar. Entweder gehen sie aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervor [Nehls et al. 1992] oder entwickeln sich durch De-Differenzierung aus arteriellen Glatten Muskelzellen [Nicosia et al. 1995]. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass während der Entwicklung funktioneller Gefäße perivaskulär gelegene mesenchymale Zellen durch direkten Einfluß der Endothelzellen in Perizyten-Vorläuferzellen umgewandelt werden [Hellström et al. 1999] (was sich in der Expression von PDGF-Rezeptor-beta zeigt, s.u.). Im Gegensatz zu perivaskulären glatten Muskelzellen werden Perizyten und Endothelzellen von der gleichen Basalmembran umhüllt. Perizyten produzieren eine Fülle von vasoaktiven Substanzen (z.B. Angiopoietin-1 unter hypoxischen Bedingungen oder nach Stimulation durch VEGF [Park et al. 2003]) und können selbst als Vorläuferzellen von anderen perivaskulären Zellen fungieren. Nach ihrer Lokalisation lassen sich drei Formen von Perizyten unterscheiden: präkapilläre, kapilläre und postkapilläre. Nur die prä- und postkapillären Perizyten exprimieren *α -smooth muscle actin* [Nehls et al. 1991]. Je höher der Blutdruck und je dichter die Endothelzellbarriere ist, desto mehr Perizyten finden sich pro Kapillarfläche (so ist der Perizytenbesatz in den Netzhautkapillaren relativ hoch [Sims 1986]). Außerdem fördert ein niedriger O₂-Partialdruck das Wachstum von Perizyten [Schor et al. 1986]. Perizyten wirken stabilisierend auf das Gefäßsystem; so haben sie auf Endothelzellen antiproliferativen Einfluß [Orlidge et al. 1987; Miyazato et al. 1991] und vermindern ihre Migration [Sato et al. 1989]. Es ist bekannt, daß von Endothelzellen gebildeter PDGF-B (*platelet-derived growth factor*) [Collins et al. 1985, Mudhar et al. 1993] positiven Einfluß auf die Rekrutierung und Proliferation von Perizyten hat [Heldin et al. 1992].

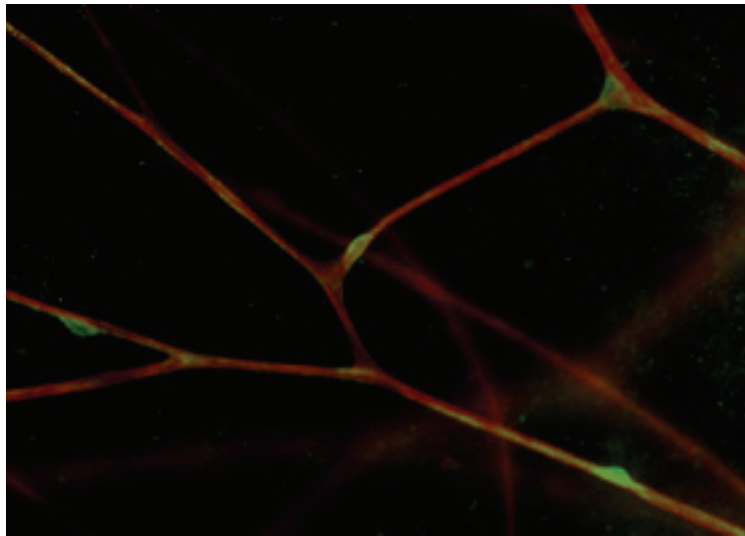


Abb. 3 Auf Kapillaren sitzende Perizyten (immunologische Darstellung)

Durch Fluorophor-Markierung eines perizyten-detektierenden Antigens (NG-2 CSP [Ozerdem et al. 2002], grün) lassen sich Perizyten gut darstellen. Die Kapillaren fluoreszieren nach TRITC-Isolectin-Immersionfärbung rötlich. Die Perizyten scheinen den Gefäßen „aufzusitzen“ und finden sich u.a. an Gefäßaufzweigungen.

Perizyten aktivierter Gefäße (z.B. Wundheilung) exprimieren verstärkt PDGF-Rezeptor-beta [Sundberg et al. 1993]. PDGF-B/PDGF-Rezeptor-beta *knock out* Mäuse zeigen eine starke Abnahme des Perizytenbesatzes der Netzhautkapillaren. Perizytenabfall wiederum bewirkt eine Instabilisierung und Schwächung der Gefäßwand, es kommt zur Ausbildung von Gefäßanomalien wie Mikroaneurysmen und sog. azellulären Kapillaren, in denen die Endothelzellen abgestorben sind [Enge et al. 2002, Hammes et al. 2002, Hellström et al. 2001, Lindahl et al. 1997]. Das Abfallen von Perizyten wird folglich bei verschiedenen mikrovaskulären Erkrankungen beobachtet. So ist es ein frühes pathologisches Ereignis bei der Diabetischen Retinopathie [Speiser et al. 1968].

1.3 Hyperglykämische Mikroangiopathie: Die Diabetische Retinopathie

1.3.1 Pathophysiologie und Klinik der Diabetischen Retinopathie

Die vaskulären Veränderungen des diabetischen Patienten gehen initial ohne belastende klinische Symptome einher und entwickeln sich schleichend, bis das irreversible Endstadium erreicht ist. Daher wird die Gefährlichkeit dieser Erkrankung in der Bevölkerung oft

unterschätzt. Diabetes mellitus („honigsüßer Durchfluss“) ist eine endokrinologische Erkrankung, die in zwei Formen auftritt. Der seltenere Typ 1 betrifft vor allem junge Menschen und geht mit einem autoimmunvermittelten absoluten Insulinmangel einher. Typ 2 ist mit weiteren Stoffwechselerkrankungen (Adipositas, Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie) Bestandteil des „Metabolischen Syndroms“ der heutigen Überflußgesellschaft. Pathogenetisch handelt es sich hierbei um einen relativen Insulinmangel (Sekretionsstörung), vergesellschaftet mit einer peripheren Insulinresistenz [Ginsberg 2000]. Beide Typen gehen mit einer ausgeprägten Hyperglykämie einher, die letztlich zu Mikro- und Makroangiopathien führen kann [UKPDS 1998]. Die Makroangiopathie zeigt sich in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, die zu den klinischen Zeichen der koronaren Herzkrankheit (KHK), des Hirnschlags (Apoplex) oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) führen können. Die Mikroangiopathie offenbart sich hauptsächlich als Glomerulosklerose, Neuropathie und Retinopathie.



Abb. 4 Augenhintergrundveränderungen bei der Diabetischen Retinopathie

A) Neovaskularisierung der Retina: Deutlich ist das neugebildete, pathologische Gefäßsystem zu erkennen, das aus der *A. centralis retinae* fächerförmig entspringt.

B) Intravitreale hämorrhagische Blutung: Die flächenhafte Blutung aus insuffizienten Gefäßen führt im Patienten zum Visusverlust oder teilweisen Erblindung. (Aus Lang, G.: „Augenheilkunde“, Thieme Verlag).

Ein sehr frühes morphologisches Zeichen der Diabetischen Retinopathie ist verminderter Zell-Zellkontakt mit anschließendem Perizytenabfall von den Kapillaren [Cogan et al. 1961, Speiser et al. 1968, Dodge et al. 1992]. Hohe Glukosekonzentrationen führen zu verschiedenen Stoffwechselveränderungen (s.u.); so werden z.B. *advanced glycation end products* (AGEs) durch nichtenzymatische Glykosylierung gebildet und letztlich auch die Expression von NF- κ B (*nuclear factor-kappaB*) in den Perizyten erhöht, die daraufhin apoptotisch zugrunde gehen [Romeo et al. 2002]. In späteren Stadien der Diabetischen

Retinopathie folgt die Ausbildung von Mikroaneurysmen und sog. azellulären Kapillaren (s. **Abb. 5**); zusätzlich kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran [Engerman et al 1989, Hammes et al. 2002]. Die Gabe von Antioxidantien wie z.B. Vitamin E und Vitamin C [Kowluru et al.2001] oder Aldose Reduktase Inhibitoren [Kador et al. 1988] verringern im Experiment die Degeneration von Perizyten und reduzieren die Ausbildung von azellulären Kapillaren. Durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität kommt es im weiteren Verlauf zu intravitrealen hämorrhagischen Blutungen (s. **Abb. 4**) und Netzhautödemen [Moss et al. 1988].

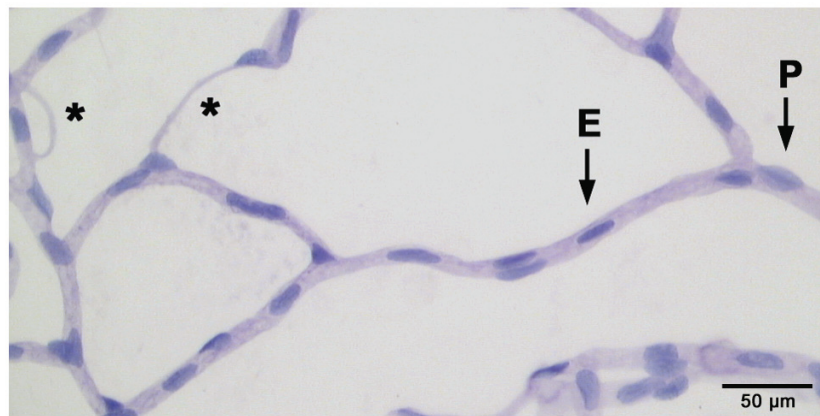


Abb. 5 Azelluläre Kapillare

Die Abbildung zeigt bei starker Vergrößerung Kapillaren der Netzhaut nach Digestion und PAS-Färbung. Aufgrund der verschiedenen Färbeeigenschaften kann man Endothelzellen von Perizyten unterscheiden. Merkmale von Perizyten sind neben dem bevorzugten Sitz an Gefäßgabelungen die blassere Färbung des Cytoplasmas und die „Stufenbildung“ durch Aufsitzen auf den Endothelzellen. Deren Kern zeigt in der PAS-Färbung eine intensivere Färbung und ist mehr lang als breit. Weiterhin erkennt man zwei azelluläre Kapillaren, die aufgrund von Gefäßokklusion ihre Funktion eingebüßt haben (**E** = Endothelzellkern, **P** = Perizyt, * = azelluläre Kapillare).

Die beschriebenen Gefäßanomalien führen u.a. zu Ablösung der Netzhaut oder zu einer Ischämie (Blutleere) bestimmter Netzhautbezirke. Die resultierende Hypoxie induziert die Expression von VEGF, was zu verstärkter Neovaskularisierung der Retina führen kann. So kommt es in Patienten, die über Jahre an manifestem Diabetes mellitus Typ 1 leiden, im fortgeschrittenen Stadium über die krankhaften Veränderungen der Netzhautgefäße in vielen Fällen zur Erblindung [Klein et al. 1984].

1.3.2 Pathogenese der Gefäßschädigung durch Hyperglykämie

Hyperglykämie kann auf molekularer Ebene über verschiedene Wege zu Gefäßschädigung führen [Brownlee 2001, Hammes 2003]. Wahrscheinlich sind jedoch alle der unten genannten

Stoffwechselwege letztlich Folge der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffradikalen und Superoxiden in der Atmungskette [Nishikawa et al. 2000]. Im einzelnen kommt es aufgrund der Hyperglykämie zu einer Zunahme des Stoffumsatzes im Citratzyklus. Daraus folgt eine Anreicherung der Protonendonatoren NADH und FADH₂. Diese verstärken das elektrochemische Potential der oxidativen Phosphorylierung (den Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran der Atmungskette), was letztlich zu einer verstärkten Bildung von Superoxiden führt. Diese aktivieren die poly(-ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), welche wiederum ein Schlüsselenzym der Glykolyse, die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, durch poly-ADP-Ribosylierung hemmt. So kommt es zu einem Anstieg von intermediären Stoffwechselprodukten („C₃-Zucker“), die über alternative pathogene Stoffwechselwege zu den Erscheinungsbildern des Diabetes mellitus führen (s.u.). Die pathologische Anreicherung dieser „C₃-Zucker“ in der Glykolyse kann durch Benfotiamin (fettlösliches Thiamin-Derivat) verhindert werden [Hammes et al. 2003], indem die Zucker durch Aktivierung einer Transketolase in „harmlose“ Produkte überführt werden, und somit nicht mehr als Substrat für die pathogenen Stoffwechselwege zur Verfügung stehen. Auch kann durch Blockierung der PARP mittels eines kompetitiven Hemmstoffs (z.B. PJ34) Hyperglykämie induzierte Angiopoietin-2 Expression reduziert werden und in Folge dessen auch Perizytenabfall und das Auftreten von azellulären Kapillaren verhindert werden. (freundliche Mitteilung Prof. Dr. H.P. Hammes).

Der Polyol-Stoffwechselweg

Bei Hyperglykämie kommt es über Aktivierung der Aldolreduktase unter Verbrauch von NADPH zu einer verstärkten Umwandlung von Glukose zu Sorbitol. Sorbitol selbst ist schlecht membrangängig und verursacht intrazellulär osmotischen Stress, wird aber unter Umwandlung von NAD⁺ in NADH weiter zu Fructose oxidiert. Eine erhöhte NADH-Konzentration führt ihrerseits wiederum zur Inhibierung der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), was in einer Akkumulierung von Triosephosphaten mündet [Williamson et al. 1993]. Diese wiederum begünstigen die Bildung von *advanced glycation end products* (AGEs) und Diacylglycerin (DAG), was wiederum die Proteinkinase C aktiviert (s.u.). Eine durch die Aktivierung der Aldolreduktase induzierte Verminderung von reduzierendem NADPH beungünstigt die Genese von reduziertem Glutathion, was im Cytosol zur Verminderung von oxidativem Stress gebraucht wird.

Gefäßschädigung durch *advanced glycation end products* (AGEs)

Desweiteren finden sich in den Gefäßen diabetischer Tiere erhöhte Mengen von *advanced glycation end products* (AGEs) [Stitt et al. 1997]. Diese werden durch intrazelluläre Hyperglykämie gebildet [Degenhardt et al. 1998]. Das geschieht zum einen durch Autooxidation von Glukose zu Glyoxal [Wells-Knecht et al. 1995], zum anderen durch Bildung von Spaltprodukten der Triosephosphate (Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat) [Thornalley 1990]. Glyoxal und die Triosephosphat-Spaltprodukte reagieren mit den Aminogruppen bestimmter Proteine letztlich zu den eigentlichen AGEs. Diese modifizieren Komponenten der extrazellulären Matrix, was zu einer erhöhten Plasmafiltration durch die *A. carotis* [Huijberts et al. 1993] und zur Verminderung der Endothelzelladhäsion führt [Haitoglou et al. 1992]. Auch führt nichtenzymatische Glycosylierung direkt zu Veränderungen der endothelialen Basalmembran. Desweiteren bewirken AGEs über Bindung an endotheliale AGE-Rezeptoren die Synthese von reaktiven Sauerstoffradikalen, eine Aktivierung von NF- κ B, indirekt den programmierten Zelltod von Perizyten [Yamagishi et al. 2002] und verstärkte Expression von VEGF [Lu et al. 1998] und Angiopoietin-2 [Okamoto, et al. 2002].

Aktivierung der Proteinkinase C

Hyperglykämie führt weiterhin zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) über verstärkte intrazelluläre Synthese von DAG [Koya et al. 1998] oder durch Aktivierung von AGE-Rezeptoren [Portilla et al. 2000]. Diese Aktivierung bewirkt abnormen Blutfluss innerhalb der Netzhaut [Ishii et al. 1996] und erhöht die Permeabilität von Endothelzellen [Hempel et al. 1997].

Der Hexoseamin-Stoffwechsel

Letztlich kann Hyperglykämie über Einschleusung von Fructose-6-Phosphat in den Hexoseamin-Stoffwechselweg positiven Einfluß auf die Expression gefäßschädigender Substanzen nehmen. So kommt es zu einer Glykosylierung des Transkriptionsfaktors SP-1 (SP-1-N-AcetylGlucosamin), was daraufhin zu einer verstärkten Expression von TGF- β [Kolm-Litty et al. 1998] und PAI-1 führt [Du et al. 2000, Chen et al. 1998, Kadonaga et al. 1988]. TGF- β verursacht eine Überproduktion von extrazellulärer Matrix, die eine Gefäßokklusion zur Folge haben kann.

Die Entgiftung gefäßschädigender Substanzen erfolgt über das Glyoxalase-System. Wird die Glyoxalase überexprimiert, kommt es zu einer Blockade der Hyperglykämie-induzierten

Angiopoietin-2 Expression in der Netzhaut. Auch führen bestimmte AGE-Inhibitoren, wie z.B. Aminoguanidin, zu einer Verminderung der mikroangiopathischen Veränderungen im Auge [Hammes et al. 1991].

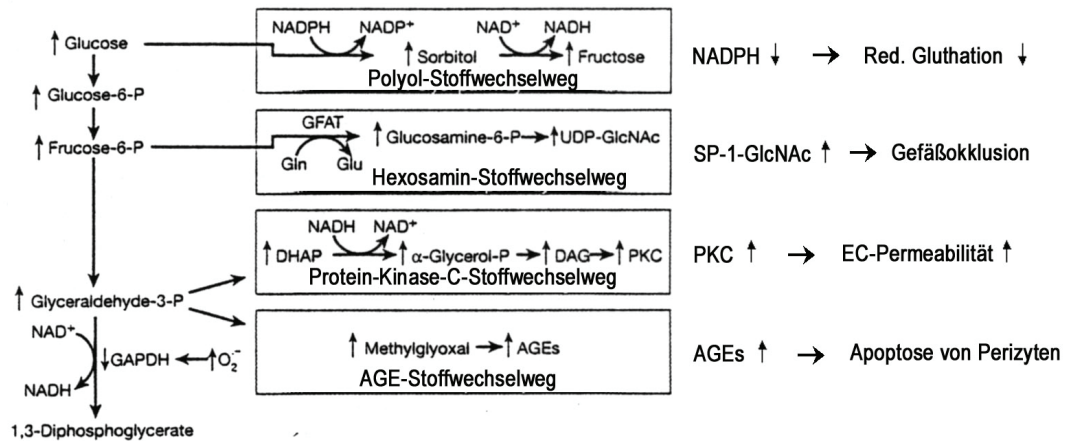


Abb. 6 Molekulare Mechanismen der Zellschädigung durch Hyperglykämie

Das Schema zeigt die verschiedenen Stoffwechselprodukte des Glukoseabbaus und ihre intrazelluläre Wirkung (Details s. Text). Die gemeinsame Ursache des erhöhten Durchsatzes der pathogenen Stoffwechselwege ist die unphysiologische Akkumulation von reaktiven Superoxiden in der Atmungskette der Mitochondrien. (modifiziert nach Brownlee et al. 2001).

Somit gibt es verschiedene Erklärungen für den gefäßschädigenden Effekt chronischer Hyperglykämie. Allerdings sind die dargestellten Mechanismen letztlich nicht endgültig bewiesen. So konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, daß hohe Glukose-Konzentrationen und Gabe von AGEs zu keiner oxidativen Schädigung und Absterben von Perizyten führen [Assero 2001]. Allerdings spricht vieles dafür, daß die vier dargestellten Mechanismen in der Pathogenese der diabetischen Angiopathie eine entscheidende Rolle spielen und letztlich auf die erhöhte Synthese von Superoxiden in der Elektronentransportkette der Mitochondrien zurückzuführen sind.

1.4 Endothelzellossoziierte Rezeptortyrosinkinasen und Wachstumsfaktoren

Rezeptortyrosinkinasen leiten als membranständige Proteine nach Bindung ihres Liganden (z.T. als Dimere oder Multimere vorliegend) Information weiter in das Zellinnere. Die extrazelluläre Bindung des Liganden führt in der Regel zur Dimerisierung und anschließenden

Autophosphorylierung des Rezeptors auf seiner cytoplasmatischen Seite [Schlessinger et al. 1992]. Über intrazelluläre Signaltransduktionsketten wird letztlich die Transkriptionsrate einer ganzen Reihe von Genen verändert, deren Expression wiederum für bestimmte Eigenschaften oder Funktionen der Endothelzelle verantwortlich sind. Regulativen Einfluß auf die Wirkung der Rezeptortyrosinkinasen kann neben der Veränderung ihrer Expressionsrate auch die regulierte Dephosphorylierung durch Phosphotyrosinphosphatasen (wie z.B. VE-PTP) oder die proteolytische Abspaltung der Extrazellulärdomänen haben [Jeffers et al. 1997; Vecchi et al. 1996, Reusch et al. 2001]. Auch sind autoinhibitorische Bereiche im C-Terminus von Rezeptortyrosinkinasen (z.B. Tie-2, s.u.) bekannt, die hemmend auf die Autophosphorylierung und die Kinaseaktivität wirken [Niu et al. 2002].

1.4.1 Tie Rezeptortyrosinkinasen

Als Rezeptortyrosinkinasen mit Einfluß auf das kardiovaskuläre System sind die im adulten Tier endothelzellspezifischen *tyrosine kinases with Ig and EGF homology domains* 1 und 2 (Tie-1 bzw. Tie-2) zu nennen. Der Aufbau der Rezeptortyrosinkinasen ist Abb. 7 zu entnehmen. Tie-1 wird u.a. während der Embryogenese exprimiert [Sato et al. 1993], Liganden für diese Rezeptortyrosinkinase sind nicht bekannt; Tie-1 *knock-out* Mäuse zeigen einen letalen Phänotyp mit starken Hämorrhagien und defekter Gefäßintegrität [Patan 1998, Puri et al. 95, Sato et al. 95]. Tie-2 hingegen exprimieren sämtliche Endothelzellen eines Organismus in allen Entwicklungsstadien, wobei die Expression in bereits etablierten Gefäßen geringer ist. Größere Gefäße exprimieren in Relation zu kleineren jedoch stärker [Dumont et al. 1992; Schnürc und Risau 1993]. Während der Tumorigenese wird die Tie-2 Expression hochreguliert [Wong et al. 1997, Peters et al. 1998, Takahama et al. 1999]. Für die gefäßspezifische Expression des Tie-2-Gens ist eine 303 Bp große Sequenz innerhalb des im ersten Intron gelegenen Enhancers alleine ausreichend [Schläger 1998]. Durch Bindung eines Liganden dimerisiert der Rezeptor. Dabei kann es offenbar auch zu heterotypischen Interaktionen zwischen Tie-1 und Tie-2 kommen [Marron et al. 2000]. Ist der Ligand aktivierend, wird die Rezeptortyrosinkinase anschließend autophosphoryliert. Somit werden *downstream* gelegene, intrazelluläre Signalwege aktiviert. Es kommt über ShcA (Adapterprotein) und Ras zur Aktivierung einer MAPK-Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*), was verstärkte Gefäßausprossung bewirkt [Audero et al. 2004]. Ein weiterer Signalweg ist die Aktivierung der PI3-/ und Akt-Kinase, was über eine Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren (Foxo-1) zu *cell-survival* führt [Peters et al. 2004, Niu et al. 2004].

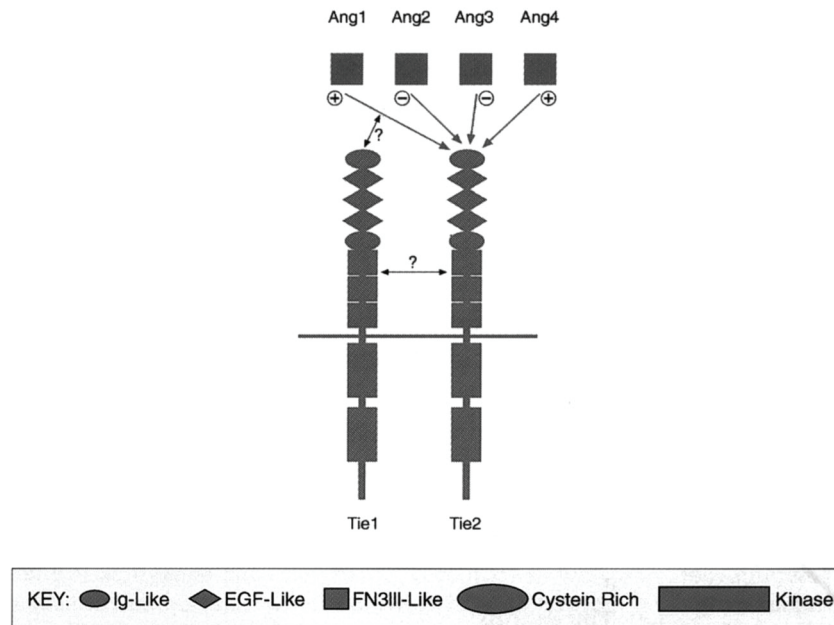


Abb. 7 Tie-Rezeptortyrosinkinasen mit ihren Liganden, den Angiopoietinen

Abgebildet sind die in Endothelzellen exprimierten Tie-Rezeptortyrosinkinasen (*tyrosine kinases with Ig and EGF homology domains*) und die Angiopoietine. Angiopoietin-1 und -2 binden nach Multimerisierung an Tie-2, allerdings kommt es nur nach Angiopoietin-1 Bindung zu einer Aktivierung (Phosphorylierung) des Rezeptors. (Nach Gale et al. 1999).

Auch die Aktivierung der P21-Kinase über Dok-R (*downstream-of-kinase-related docking protein*) ist nach Angiopoietin-1 Bindung an Tie-2 beschrieben [Master et al. 2001, Jones et al. 2003]. Zusätzlich kann Tie-2 ligandenunabhängig durch *shear-stress* aktiviert werden, was ebenfalls zur Aktivierung der PI3- und Akt-Kinase führt [Lee et al. 2003].

Tie-2 *knock out* Mäuse zeigen einen unvollkommenen Umbau („*remodelling*“) von Gefäßen in den *Plexus* des Dottersacks und des Gehirns sowie unzureichende Trabekularisierung des Herzens. Die Tiere versterben zwischen Tag E9.5 und E10.5 [Dumont et al. 1994; Sato et al. 1995; Suri et al. 1996]. Die VEGF-abhängige, zu einem einfachen Gefäßnetz führende Vaskulogenese ist von einem Tie-2 oder Angiopoietin-1 *knock out* (kompletter Tie-2 bzw. Angiopoietin-1 Mangel) nicht betroffen. Das Angiopoietin/Tie-System ist somit entscheidend für den Umbau, die Reifung und die Stabilisierung des kardiovaskulären Systems. Behandlung mit PMA [Reusch et al. 2001] und VEGF-Expression [Yabkowitz et al. 1999] führt zur proteolytischen Abspaltung der Tie-1 Extrazellulärdomäne. Weiterhin bewirkt VEGF (s.u.) die Ausbildung zweier verschiedener Formen des Tie-1/Tie-2 Heterodimers in Endothelzellen [Tsiamis et al. 2002]. Intravitreale Injektion von löslichem Tie-2 (sTie-2-Fc) verhindert im Maus-Modell Ischämie-induzierte Neovaskularisierung der Netzhaut [Takagi et

al. 2003]. Die lösliche Form kommt allerdings auch physiologischer Weise im Organismus vor und ist in Patienten mit koronarer Herzkrankheit erhöht [Chung et al.2003].

1.4.2 Die Angiopoietine

Liganden für Tie-2 sind die Angiopoietine [Davis et al. 1996], von denen vier verschiedene Vertreter bekannt sind, die alle an Tie-2 binden. Die Bindung erfolgt über die C-terminale, Fibrinogen-ähnliche Domäne der Angiopoietine, die Dimerisierung über ihre *coiled-coil* Domäne und die Bildung von Multi-Dimeren über die N-terminale *superclustering*-Domäne [Davis et al. 2003]. Angiopoietin-2 ist ein glykosyliertes, 75 kD großes Protein, das aus 496 Aminosäuren besteht und mit Angiopoietin-1 ca. 60% Homologie zeigt. Es wird von Endothelzellen gebildet, in Weibel-Palade-Körpern gespeichert [Fiedler et al. 2004] und wirkt autokrin auf seinen endothelzellspezifischen Rezeptor, wahrscheinlich nach Bildung von Homodimeren und deren Multimeren (s.u.) [Procopio et al. 1999]. Die Sequenz des humanen Angiopoietin-2 ist zu 85% mit der des murinen Proteins identisch. Expression von Angiopoietin-2 findet sich physiologischer Weise in Bereichen, wo Gefäßumbau stattfindet. So z.B. während der Vaskularisierung der Netzhaut, bei der Neuorganisation von Gefäßen des Ovars im weiblichen Reproduktionszyklus [Maisonpierre et al. 1997, Goede et al. 1998], oder in den Gefäßen von Tumoren [Stratmann et al. 1998, Holash et al. 1999]. Angiopoietin-1 hingegen wird von mesenchymalen Zellen gebildet, wirkt somit parakrin und ist während der Embryogenese und im adulten Organismus am stärksten im Herzen exprimiert [Suri et al. 1996, Maisonpierre et al. 1997, Gale et al. 2002]. Nach Procopio et al. 1999 soll es zu Homotrimeren und entsprechenden Multimeren assoziieren, neuere Studien hingegen zeigen, daß Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 identische Multimere bilden und daß ihre unterschiedliche Wirkung in den verschiedenen Rezeptorbindedomänen (Fibrinogen-ähnliche Domäne) liegt [Davis et al. 2003]. Tetramere wären demnach die kleinsten funktionellen Multimere, um in Endothelzellen Tie-2 zu aktivieren. Eine gentechnisch synthetisierte Variante von Angiopoietin-1 (Ang-1*) bildet keine Multimere, kann aber dennoch Tie-2 aktivieren [Maisonpierre et al. 1997]. Das murine Angiopoietin-3 und das humane Angiopoietin-4 werden von entsprechenden Genloci auf den syntenen Abschnitten der jeweiligen murinen und menschlichen Chromosomen kodiert, jedoch stimmen die beiden Proteine in ihrer Aminosäuresequenz letztlich nur zu 54 % überein [Valenzuela et al. 1999], was sich auch in ihren unterschiedlichen Auswirkungen auf Tie-2 widerspiegelt. Der überwiegende Teil aktueller Publikationen zu den Angiopoietinen behandelt jedoch Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2.

In Blutgefäßen bewirken ausschließlich Angiopoietin-1 und Angiopoietin-4 über die Bindung an Tie-2 eine Phosphorylierung des Rezeptors. Nach Bindung von Angiopoietin-2 kommt es dagegen zu keiner Aktivierung. Angiopoietin-2 vermag dies nur *in vitro* nach 24h Inkubation von HUVECs oder in mit Tie-2 DNA transfizierten Fibroblasten [Teichert-Kuliszewska et al. 2000, Maisonpierre et al. 1997]. Vielmehr reduziert Angiopoietin-2 die durch Angiopoietin-1 induzierte Phosphorylierung von Tie-2 und könnte so antagonistisch auf die Angiopoietin-1 vermittelte Gefäßstabilisierung wirken [Maisonpierre et al. 1997]. Im Lymphsystem spielt Angiopoietin-2 ebenfalls eine wichtige Rolle [Veikkola et al. 2002] und scheint dort als Angiopoietin-1 Agonist zu wirken [Gale et al. 2002]. Expression von Tie-2 in Lymphendothelzellen konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden. Das weitere Schicksal der Gefäße mit hoher Angiopoietin-2 Expression hängt davon ab, ob VEGF ebenfalls hoch reguliert ist. So führt VEGF-Expression in den zuvor durch Angiopoietin-2 destabilisierten Gefäßen zu Angiogenese und Expression von Matrixmetalloproteasen, die Proteine der Basalmembran abbauen [Etho et al. 2001]. Abwesenheit von VEGF resultiert jedoch in Gefäßregression [Asahara et al. 1998, Maisonpierre et al. 1997, Lobov et al. 2002, Holash et al. 1999]. Auch Angiopoietin-2 erhöht die Expressionsrate der Matrixmetalloprotease MMP-2 [Hu et al. 2003], die Voraussetzung für eine funktionelle Angiogenese ist. Es wird vermutet, daß Angiopoietin-2 auf diese Weise zu einer Destabilisierung der Bindung zwischen perivaskulären Zellen und dem Endothel führt, so daß der mitogene Effekt von VEGF auf das nun instabile Gefäßsystem ein Ausprossen von Kapillarästen bewirkt.

Während der Vaskularisation der Retina via Angiogenese ist Angiopoietin-2 besonders zur Zeit der Ausbildung des tiefen Kapillarbett ab Tag P8 hochreguliert. Folglich kommt es in Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen zu keiner Ausbildung der mittleren und tiefen Kapillarbetten der Netzhaut. Die Etablierung eines oberflächlichen primären Gefäßnetzes findet in den *knock out* Mäusen, wenn auch inkomplett und verzögert, statt. Auch ist die Regression der Hyaloidgefäße nur unvollständig [Hackett et al. 2000, 2002]. Das Lymphgefäßsystem der Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen scheint insuffizient, die Tiere entwickeln einen chylösen Aszites. Experimentell konnte in adulten Ratten durch Einsatz von Angiopoietin-2 bindender RNA (Aptamere) die Neovaskularisation im „cornea micropocket assay“ inhibiert werden [White et al. 2003]. Die Expression von Angiopoietin-2 wird, im Gegensatz zu Angiopoietin-1, unter hypoxischen Bedingungen [Hackett et al. 2000, Yuan et al. 2000, Krikun et al. 2000] sowie unter Einfluß von VEGF [Oh et al. 1999, Park et al. 2003] gesteigert. Auch wird Angiopoietin-2 nach längerer Hyperglykämie in Müllerzellen

(persönliche Mitteilung Prof. Dr. H. P. Hammes), während der Vaskularisierung der Netzhaut in Horizontalzellen [Hackett et al. 2000] und nach TNF- α Stimulation [Kim et al. 2000] verstärkt exprimiert. In Gewebe von Patienten, die unter ischämischen Netzhauterkrankungen leiden, konnte ebenfalls eine verstärkte Expression von Angiopoietin-2 festgestellt werden [Takagi et al. 2003].

Angiopoietin-1 besitzt selbst keinen proliferativen Effekt auf Endothelzellen, hat aber *tube-formation* und *sprouting* (Ausbildung von „Gefäßsprossen“) [Hayes et al. 1999, Koblizek et al. 1998] sowie verstärkte Gefäßbildung nach Überexpression zur Folge. Auch zeigen Tiere, die Angiopoietin-1 überexprimierende Tumoren tragen, einen erhöhten Perizytenbesatz auf den Tumorgefäßen [Stoeltzing et al. 2003]. In anderen Studien hingegen führt Angiopoietin-1 zu einer Stabilisierung neu geformter Gefäße, indem es deren Permeabilität vermindert [Thurston et al. 1999, 2000, Joussen et al. 2002], in Gegenwart von VEGF Perizyten rekrutiert [Asahara et al. 1998] und einen antiapoptotischen Effekt auf Endothelzellen ausübt, der durch gleichzeitige Gabe von VEGF verstärkt wird [Kwak et al. 1999].

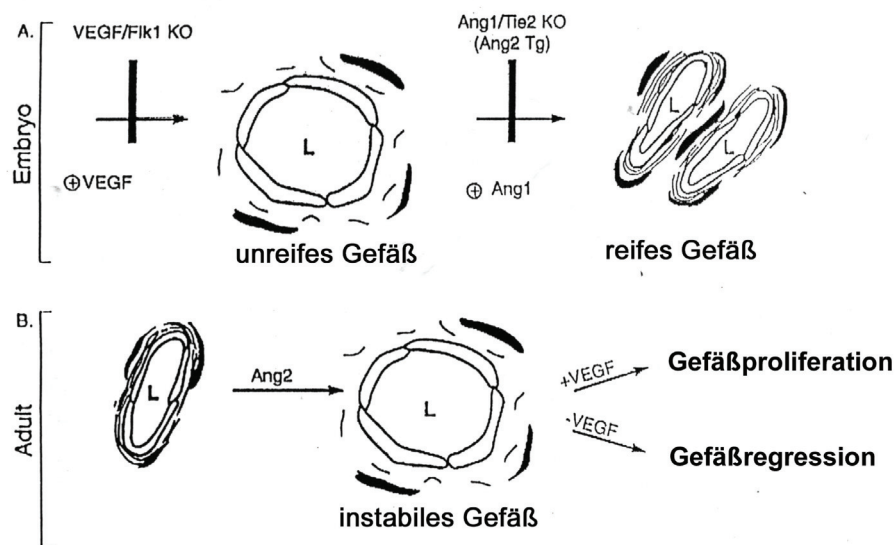


Abb. 8 Zusammenspiel ausgewählter Rezeptoren und Liganden bei der Gefäßbildung im embryonalen und adulten System

A) Das Ausschalten bestimmter Faktoren (senkrechte schwarze Balken) führt während der Embryogenese zu unterschiedlichen Gefäßphänotypen. So unterbleibt im VEGF-R2 K.O. die Ausbildung eines primären Gefäßplexus. Nach Ausschalten von Angiopoietin-1 bzw. Tie-2 ist keine Reifung der Gefäße zu beobachten, das Gefäßnetz ist insuffizient, die Tiere sterben postnatal.

B) Im adulten Tier führt Angiopoietin-2 zu einer Auflockerung und Instabilisierung der Gefäße, was diese anfällig für proliferative Stimuli macht oder zur Gefäßregression führt. (L = Lumen). (Nach Hanahan, D. 1997).

Durch Injektion eines Antikörpers gegen PDGF-Rezeptor- β und folgendem Perizytenverlust konnte die Ausbildung von Gefäßanomalien induziert werden. Angiopoietin-1 Gabe antagonisiert diesen Effekt und bewahrt die Integrität der Netzhautkapillaren [Uemura et al. 2002]. Die verschiedenen, z.T. gewebsspezifischen Wirkungen der Angiopoietine (s. **Abb. 8**) zeigen, daß das Tie-2/Angiopoietin-System sehr komplex reguliert wird und die Aussage nicht immer gilt, daß Angiopoietin-2 der Antagonist von Angiopoietin-1 ist. So werden außerdem durch alternatives *splicing* mehrere verschiedene Angiopoietin-2 mRNAs zu verschiedenen Isoformen des Proteins translatiert [Kim et al. 2000]. Bekannt ist die Existenz von biologisch unterschiedlich aktiven Isoformen eines Proteins mit Einfluss auf das Gefäßsystem bereits für VEGF [Stalmans et al. 2002]. Für Angiopoietin-2 Isoformen im Huhn konnte gezeigt werden, dass deren C-Terminus (zur Bindung an Tie-2) identisch ist, der N-Terminus (zur Multimerisierung) sich hingegen unterscheidet [Mezquita et al. 2000]. Eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung der Angiopoietin-Wirkungen ist die Variation des Rezeptorkomplexes (Tie-1/Tie-2 Heterodimerbildung, proteolytische Abspaltung der Extrazellulärdomäne). Daneben hat die Koexpression von anderen Faktoren, wie z.B. VEGF, einen großen Einfluß auf den resultierenden Effekt einer Angiopoietin-Tie-Interaktion.

1.4.3 VEGF bindende Rezeptortyrosinkinasen

Einfluß auf die Gefäßentwicklung und Funktion haben im Besonderen Mitglieder der gefäßendothelspezifischen *vascular endothelial growth factor*-Rezeptoren (VEGFR-1 [Flt-1], VEGFR-2 [Flk-1/KDR] und VEGFR-3 [Flt-4]) [de Vries et al. 1992; Joukov et al. 1996; Millauer et al. 1993; Terman et al. 1992], wobei VEGFR-3 im adulten Säugetier bevorzugt in lymphatischem Endothel exprimiert wird [Kukk et al. 1996]. Für die genannten Rezeptoren existieren 6 bekannte Liganden, PlGF sowie VEGF-A bis -E, von denen der am besten untersuchte VEGF-A an Flt-1 und Flk-1 bindet. VEGF-A wirkt über Flk-1 mitogen und chemotaktisch auf Endothelzellen [Waltenberger et al. 1994, Ferrara et al. 1992] und ist *in vivo* zunächst unverzichtbar für eine korrekte Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung [Shalaby et al. 1995; Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß VEGF die Permeabilität von Gefäßen erhöht [Berse et al. 1992, Conolly et al. 1992] und in Anwesenheit von Angiopoietin-2 Angiogenese induziert [Asahara et al. 1998]. Unter Einfluß von AGEs [Lu et al. 1998] oder hypoxischen Bedingungen [Shweiki et al. 1992, Pierce et al. 1995] wird VEGF in der Netzhaut hochreguliert. Dies führt zu verstärkter Neovaskularisation im Auge. Dieser Effekt konnte ebenfalls nach Überexpression von VEGF in der Retina beobachtet werden [Okamoto et

al.1997, Ohno-Matsui et al. 2002]. Wird VEGF jedoch inhibiert, kommt es zu einer verminderten Neovaskularisation innerhalb der Netzhaut [Aiello et al. 1995]. VEGF beschleunigt weiterhin indirekt die Perizyten-Rekrutierung und kann somit protektiv auf das unreife Kapillarbett der Netzhaut wirken [Benjamin et al. 1998]. Zusätzlich beeinflusst VEGF das Tie-System, indem es förderlich auf die proteolytische Abspaltung der Tie-1 Extrazellulärdomäne und damit die Erzeugung löslicher Rezeptoreinheiten wirkt [Yabkowitz et al. 1999], sowie zur Expression eines inkompletten Tie-1 Rezeptors in Endothelzellen führt [Tsiamis et al. 2002]. (Zum Überblick über die VEGF-Familie: s. Neufeld et al.1999, Carmeliet und Collen, 1999).

1.5 Retrovirale Expressionsvektoren

Um die Wirkung eines Proteins innerhalb eines Organismus zu untersuchen oder dieses als Therapeutikum einzusetzen, kann man es entweder direkt injizieren, als Transgen zur Expression bringen, oder mit Hilfe von viralen Expressionsvektoren in den Organismus einschleusen. Die Applikation von nativem Protein wäre als therapeutische Maßnahme nur bedingt möglich; so würde das Protein nach Injektion durch den Organismus abgebaut und inaktiviert werden. Wiederholte Injektionen mit hoher Belastung des Patienten wären notwendig. Für ein therapeutisches Vorgehen im Rahmen der Diabetischen Retinopathie eignet sich daher eher der Einsatz von viralen Vektoren. Deren Applikation erfordert theoretisch nur eine einmalige Manipulation des Patienten und gewährleistet nach erfolgreicher Infektion der Zielzellen eine stete Überexpression des gewünschten Proteins.

1.5.1 Retroviren

Im Vergleich zu Vertretern anderer Virus-Familien integrieren Retroviren ihr Genom während des Replikationsvorganges in die DNA der Wirtszelle. So werden die DNA-Sequenzen der Viren bei der Zellteilung des Wirtsgewebes vertikal weitergegeben und gewährleisten eine theoretisch unbegrenzte Expressionsdauer der Virusproteine. Im einzelnen erfolgt die Infektion der Zielzelle durch Retroviren [Rous 1910, Temin et al. 1970] über bestimmte Oberflächenrezeptoren, die das Wirtsspektrum der einzelnen Viren-„Quasispezies“ bestimmen. Nach Aufnahme in die Zelle und anschließender Befreiung des Virus-Capsids folgt die reverse Transkription des RNA-Virus-Genoms in DNA und die Integration in das Genom der Wirtszelle. Die benötigten Enzyme liegen im Viruspartikel bereits in begrenzter Zahl vor, so dass die geschilderten virusspezifischen Vorgänge überhaupt möglich sind.

Anschließend wird der zelluläre Transkriptions- und Translationsapparat zur Expression der viralen Gene genutzt (s. **Abb. 9**).

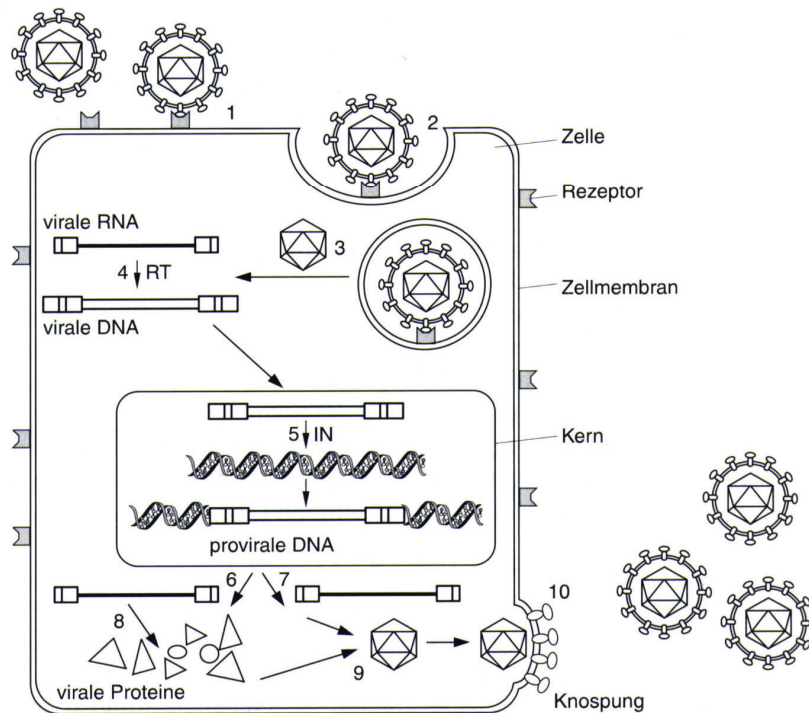


Abb. 9 „Lebenszyklus“ der Retroviren

Während der Infektion nehmen die Viren über bestimmte Oberflächenrezeptoren Kontakt mit den zu infizierenden Wirtszellen auf (1) und werden anschließend phagozytiert (2). Nach der Befreiung des Virus-Capsids (3) aus der Membranhülle (*envelope*) wird das virale RNA-Genom mit Hilfe der mitgebrachten viralen reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben (4). Diese wird anschließend als „Provirus“ in das Genom der Zelle eingebaut (5). Im Zuge der zelleigenen Biosynthese werden auch die Gene des Provirus transkribiert (6+7) und ein Teil der RNA translatiert (8). Letztlich kommt es zur Synthese eines neuen Capsids aus viralen Strukturproteinen und dem RNA-Genom (9). Mit der abschließenden Knospung (10) erhalten die Capside ihre Membranhülle und werden als infektiöse Viren aus der Zelle freigesetzt. (Aus Günzburg, W.H., Salmons, B.: „Gentransfer in Säugetierzellen“, Spektrum Verlag).

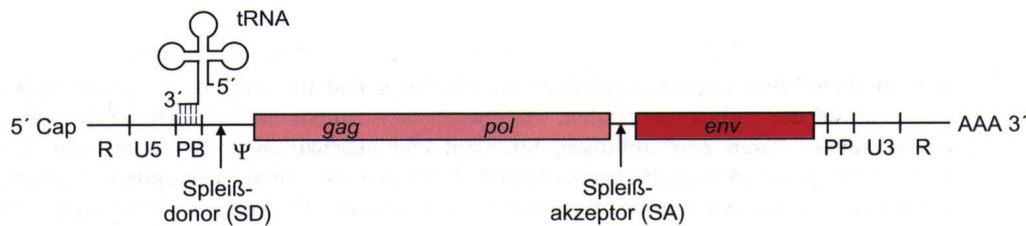
Ist die Infektion erfolgreich, kann somit ein bestimmtes Protein über einen längeren Zeitraum in einem Gewebe überexprimiert werden. Als Promoter-Sequenzen dienen die während der reversen Transkription erzeugten *long terminal repeats* (s. **Abb. 10**). Die von uns verwendeten retroviralen Expressionsvektoren sind so modifiziert, dass eine zuvor einklonierte DNA-Sequenz statt der retroviralen Strukturproteine im Zielgewebe exprimiert wird und die Retroviren daher replikationsdefizient sind (s.u.).

1.5.2 Retroviren als Expressionsvektoren

Die verwendeten Retroviren (pLXSN, Fa. Clontech) leiten sich von dem *Moloney murine leukemia virus* und vom *Moloney murine sarcoma virus* ab (s. **2.3.1**) [Coffin et al. 1996, Miller et al. 1986]. Als ecotropes Virus infiziert es ausschließlich spezielle Nagerzellen. Ein

weiteres sicherheitstechnisches Merkmal dieser rekombinanten Viren ist die Eigenschaft, nach einmaliger Infektion der Wirtszellen keine weiteren infektiösen Viruspartikel produzieren zu können. Den replikationsinkompetenten Viren fehlen die *gag*, *pol* und *env* Strukturgene; sie können sie sich daher nur innerhalb einer bestimmten Zelllinie (GP+E86-Zellen) vermehren, die diese Proteine exprimiert (Details s. 2.3.1).

A. RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels



B. Integrierte Provirus-DNA

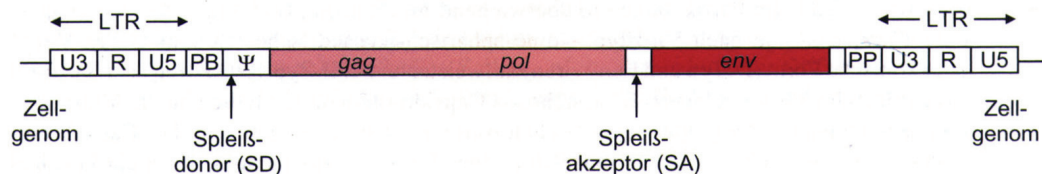


Abb. 10 Aufbau der Retrovirus RNA und der integrierten Provirus-DNA

A) RNA-Genom eines Retrovirus **B)** Provirus-DNA nach reverser Transkription: beachte die nur in der DNA vorkommenden LTR (*long terminal repeats*), die als Promotersequenzen dienen. Die rot markierten Elemente der Virus-DNA fehlt den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren. An ihrer Stelle sitzen die einklonierten DNA-Sequenzen (Reportergen bzw. Angiopoietin-2). (Aus Günzburg, W.H., Salmons, B.: „Gentransfer in Säugetierzellen“, Spektrum Verlag).

Zur Durchführung der geplanten Experimente wird das klonierte Virusgenom (DNA) mittels Calciumphosphat-Präzipitation in die Verpackungszelllinie (GP+E86-Zellen) transfiziert (s. 2.4.4). Dort erfolgt die Synthese infektiöser Viruspartikel mit Hilfe der von den Verpackungszellen synthetisierten retroviralen Proteinen. Die so erzeugten Viruspartikel reichern sich im Überstand der Verpackungszellen an. Nach der Transformation werden mehrere Verpackungszell-Klone isoliert (s. 2.4.5) und die jeweilige Produktionsrate an Viren ermittelt (s. 2.4.6). Bevor die Viren in das Auge des Versuchstieres injiziert werden, erfolgt eine Aufkonzentration des virushaltigen Überstands mittels Ausschlussfiltration. Als Expressionskassette tragen die von uns klonierten Viren die DNA-Sequenzen der alkalischen Phosphatase der Plazenta (PLAP), der β -Galaktosidase (LacZ) und des humanen Angiopoietin-2.

1.5.3 Die Verpackungszelllinie

Zur quantitativen Synthese von infektiösen Viruspartikeln sind neben den viralen Strukturproteinen und dem Verpackungssignal auch wirtsfremde Enzyme notwendig. Aus sicherheitstechnischen Gründen werden die jeweiligen Sequenzen zum einen von den Viren selbst, zum anderen von den Verpackungszelllinien codiert (GP+E86-Zellen). Diese Verpackungszelllinie enthält zwei unabhängige Konstrukte, welche die *gag*-, *pol*- und *env*-Genprodukte exprimieren [Markowitz et al 1988], (s. **Abb. 11**). Hierdurch sinkt die Wahrscheinlichkeit, daß durch Rekombinationsereignisse zwischen Vektor und den Verpackungskonstrukten replikationskompetente Standardviren entstehen (s. **Abb. 11**, Box). Die Verpackungszelllinie enthält keine G418-Resistenz (Neomycin-Analogen). Zur Virus-Synthese werden die Zellen mit Vektor-DNA transfiziert, die eine G418-Resistenz trägt. Daher ist es möglich, die erfolgreich transfizierten GP+E86-Zellen durch G418-Gabe zu isolieren.

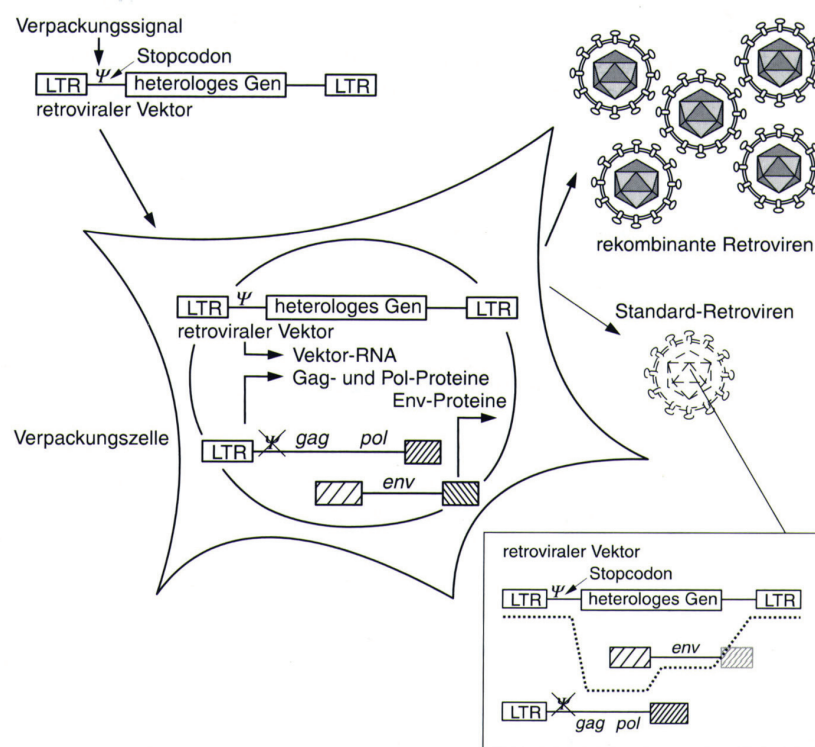


Abb. 11 Überblick über die dritte Generation retroviraler Vektorsysteme

Das rekombinante Virusplasmid mit der heterologen (xenogenen) DNA-Sequenz wird in die Verpackungszelllinie transfiziert. Hierdurch erhält die Zelle die gesamte Information zur Synthese infektiöser Viruspartikel (s. Text). Da die benötigten DNA-Sequenzen aus Sicherheitsgründen auf drei Genloci verteilt sind, ist die Wahrscheinlichkeit für ungewollte Rekombinationen (s. Kasten) äußerst gering. (Aus Günzburg, W.H., Salmons, B.: „Gentransfer in Säugetierzellen“, Spektrum Verlag).

Zur Vereinzelung der GP+E86-Klone werden die Zellen in geringer Konzentration ausgesät, so dass die wachsenden Klone leicht isoliert und vermehrt werden können. Die Verpackungszellen produzieren infektiöse Viruspartikel, die sich im Zellüberstand anreichern. Zur Identifizierung derjenigen GP+E86-Klone, die die höchste Viruszahl produzieren, werden Titertests mit 3T3-Fibroblasten durchgeführt (s. 2.4.7)

1.6 Die Ratte als molekularbiologisches Modell

Um wissenschaftliche Fragestellungen zu beantworten, kann man die Untersuchungen in verschiedenen Bezugssystemen durchführen. So besteht die Möglichkeit, außerhalb eines Organismus mit dessen Zellen oder Geweben *in vitro*-Studien durchzuführen. Diese zeichnen sich durch leichtere Handhabung und meist einfacheren Aufbau der Versuchssituation aus. Nachteil ist, daß einzelne „Funktionseinheiten“ eines Gesamtorganismus aus diesem herausgenommen und vom Kontext isoliert betrachtet werden. So ist nicht sicher, ob Effekte, die sich *in vitro* zeigen, *in vivo* reproduzierbar sind. Um Studien durchzuführen, die alle Regulationsmechanismen und mögliche Einflüsse eines gesamten Organismus berücksichtigen, wählt man *in vivo*-Experimente. Die in diesen Studien nachgewiesenen Effekte kommen unter Einbeziehung aller zellulären und subzellulären Komponenten eines Gewebes oder Organsystems zustande und sind somit sehr aussagekräftig.

Daher wurde in dieser Arbeit als *in vivo*-Modell die Ratte und die Maus gewählt. Als Angehörige der „echten Mäuse“ (Familie *Muridae*) zeichnen sie sich durch hohe Nachkommenzahl, frühe Fertilität, geringen Platzbedarf und Möglichkeit der Haltung in Gruppen aus. Somit sind „echte Mäuse“ ein optimales Säugetier-Modell. Die murinen Gewebsstrukturen gleichen zum größten Teil den humanen, so daß sich die gewonnenen Erkenntnisse im wesentlichen auch auf den Mensch übertragen lassen, was besonders für die Entwicklung therapeutischer Ansätze Voraussetzung ist.

Die durchgeführten Experimente beschränkten sich auf das Auge der Versuchstiere. Dieses Organ entwickelt sich während der Embryogenese aus Teilen des Zwischenhirns und stellt einen Ort verminderter Immunkompetenz da. Dies ist von besonderem Vorteil, da in dieser Arbeit retrovirale Vektoren in die Netzhaut der Versuchstiere injiziert werden sollen und eine starke Immunantwort die Infektionsrate vermindern würde. Neben den verwendeten Wildtyp-Ratten wird in dieser Arbeit auch eine transgene Mauslinie verwendet (s. 2.2.6).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Ein sehr frühes Ereignis im Krankheitsbild der Diabetischen Retinopathie ist der Abfall von Perizyten vom Kapillarnetz der Retina. Diesem Ereignis folgt die Ausbildung schwerer Gefäßanomalien, die letztlich zu dem klinischen Bild einer diabetischen Mikroangiopathie im Auge führen können. Bereits bekannt ist, daß in den Netzhäuten diabetischer Tiere der Angiopoietin-2 Promoter aktiviert wird [Hammes et al. 2004]. Auf die Hochregulation von Angiopoietin-2 folgt ein Abfall der Perizyten von den Netzhautkapillaren. In früheren Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die intravitreale Injektion von nativem Angiopoietin-2 und die Überexpression von Angiopoietin-2 in transgenen Mäusen zu einem signifikanten Perizytenabfall von den Netzhautkapillaren führt. Daher wäre das Ausschalten des Angiopoietin-2 vermittelten Perizytenabfalls ein idealer Ansatzpunkt, die Diabetische Retinopathie in einem frühen Stadium zu therapieren. Zur Testung der dafür in Frage kommenden Moleküle (z.B. Angiopoietin-2 Antagonisten) wäre es hilfreich, ein Tiermodell zur Verfügung zu haben, das exakt das Stadium des Perizytenabfalls zeigt. Um ein Protein in einen Organismus einzuschleusen, kann man es entweder direkt injizieren, als Transgen exprimieren, oder mit Hilfe von viralen Expressionsvektoren in den Organismus einbringen. Letztere eignen sich für eine gezielte Applikation besonders gut, da sie theoretisch eine stete Expression des gewünschten Proteins im Zielgewebe gewährleisten, zur Virusapplikation eine einmalige Manipulation am Auge ausreichend ist und Tiere beliebigen Alters verwendet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob es möglich ist, mit Hilfe retroviraler Vektoren humanes Angiopoietin-2 in die Netzhaut einzuschleusen, um so ein frühes Stadium der Diabetischen Retinopathie in Form von Perizytenabfall zu simulieren. Hierzu wurden zum einen Retroviren genutzt, die als Vektoren eine Reportergen-Sequenz tragen. Durch Analyse des Reportergen-Expressionsmusters in der Netzhaut können qualitative und quantitative Aussagen über die Infektiosität der verwendeten Retroviren und deren Potenz zur Expression exogener DNA-Sequenzen gemacht werden. Desweiteren wurden Viren kloniert, die als „Passagiersequenz“ die Angiopoietin-2 cDNA tragen. Durch statistische Auswertung des Perizytenbesatzes der manipulierten Tiere kann man somit Rückschlüsse auf die Qualität des geplanten Tiermodells ziehen. Wäre es mit Hilfe der retroviralen Vektoren möglich, das beschriebene Tiermodell zu erzeugen, könnten Studien zur therapeutischen Wirksamkeit verschiedener Angiopoietin-2 Antagonisten elegant durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Blot-Transfer-Zelle Semi-Dry Trans-Blot SD (Fa. BioRad)
Brutschrank für Bakterienkultur B5060E (Fa. Heraeus)
Brutschrank für Zellkultur IR-Autoflow, CO₂-begast (Fa. Nuaire)
Dissektionsmikroskop Stemi SV6 + Kameraaufsatz MC80 (Fa. Zeiss)
Eiserzeuger AF-10 (Fa. Scotsman)
Flachbettgelkammer MGU 500T (Fa. C.B.S. Scientific)
Flachbettgelkammer SGE-030-02 (Fa. C.B.S. Scientific)
Gelkammer Mini-Protean II (Fa. BioRad)
Heizrührer Ikamag RCT (Janke & Kunkel)
Kaltlichtlampe KL1500 electronic (Fa. Zeiss)
Kühlzentrifuge 4K10 (Fa. Sigma)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Fa. Heraeus)
Laborwaage MC1 Laboratory LC4800P (Fa. Sartorius)
Mikroskop Axiovert 135 (Fa. Zeiss)
Mikroskop Wiloverts (Fa. Will / Hund)
Netzgerät Modelle E455, E743 und E702 (Fa. Consort)
PCR-Gerät Robocycler Gradient 96 (Fa. Stratagene)
Photometer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio (Fa. Perkin Elmer)
Pipette Pipetman (Fa. Gilson)
Reaktionsgefäßschüttler VF2 (Fa. Janke & Kunkel)
Röntgenfilmentwickler M35 X-OMAT Processor (Fa. Kodak)
Schüttelinkubator Modell HT (Fa. Infors)
Sequenzgelapparatur 373 Stretch (Fa. Applied Biosystems)
Sterilarbeitsplatz A/B3 (Fa. Nuaire)
Stickstofftank Chronos Biosafe (Fa. Messer Griesheim)
Thermomixer 5436 (Fa. Eppendorf)
Tiefkühlschrank HFU 86 (Fa. Heraeus)
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (Fa. Eppendorf)
UV-Lichttisch 312 nm + 254 nm (Fa. Bachofer)

Wasserbad Modelle SW, SW-20C und FC 200 (Fa. Julabo Labortechnik)

Wasserbad LKB Multitemp II (Fa. Pharmacia)

Wippschüttler Rocky (Fa. Uniequip Laborgerätebedarf)

Für die verwendete Kühlzentrifuge „Biofuge Fresco“ errechnet sich die relative Zentrifugalbeschleunigung nach der Formel: $RZB = 11.18 \times (n/1000)^2 \times r$; wobei n = Umdrehungen/min und r = Radius (= 7.3 cm)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße, 0.2 – 2.0 ml (Fa. Eppendorf)

Röhrchen 15 ml und 50 ml (Fa. Falcon)

Film, Kunstlicht 64 ASA EPYT (Fa. Kodak)

Gewebekulturgefäße (Fa. Costar, Greiner, Nunc)

Sterilfilter 0.2 µm (Fa. Schleicher & Schuell)

Schaber zur Zellernte (Fa. Costar)

Zentrifugationsgefäße 14 ml (Fa. Greiner)

Pipettenspitzen (Fa. Greiner)

Hyperfilm ECL (Fa. Amersham Life Science)

Nitrozellulose Transfer Membran Protran BA83 (Fa. Schleicher & Schuell)

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Die eingesetzten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad (p.A.) von folgenden Firmen bezogen: Difco, Gibco BRL, J.T. Baker, Merck, Riedel-de Haen, Roth, Serva, Sigma. dNTPs von der Fa. Eurogentech. Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Clontech, Eurogentech, Gibco BRL, New England Biolabs und MBI-Fermentas bezogen, T4 DNA-Ligase und Proteinase K von Boehringer-Mannheim. *Taq*-Polymerase lieferte die Firma Promega. Antikörper wurden von den Firmen R&D Biosystems und Dako bezogen.

Als Größenmarker kamen folgende Substanzen zum Einsatz: DNA-Größenmarker: 1kB DNA-Leiter (Fa. Gibco BRL); Protein-Größenmarker: Prestained SDS-PAGE Standard, „High Range“ (Fa. BioRad).

Lösungen:

5 x TBE:	54 g Tris-Base, 27.5 g H ₃ BO ₄ , 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, ad 1 l H ₂ O
5 x Ladepuffer:	50% Glycerin, 0.2 % Bromphenolblau, 0.2 % Xylencyanol
TE (T0.1E):	10mM Tris (NH ₂ C[CH ₂ OH] ₃) pH 7.5, 1 mM EDTA (0.1 mM EDTA)
NEB 1,2,3:	Standard-Restriktionspuffer der Fa. New England Biolabs
100 x BSA:	bovines Serumalbumin (10mg/ml-Lösung, Fa. New England Biolabs)
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄
10 x TBST:	200 mM Tris, 1.5 M NaCl, 0.5% TWEEN 20; pH 7.5
Stripping-Puffer:	62.5 mM Tris, 2%SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol; pH 6.8
Semi-Dry-Puffer:	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.037 % SDS (v/v), 20 % Methanol
10 x Laufpuffer nach Lämmli:	250 mM Tris, 1.92 M Glycin, 1 % SDS (w/v); pH 8.3
6 x Auftragspuffer nach Lämmli:	200 mM Tris, 6 % SDS (w/v), 27 %Glycerin, 0.1 % Bromphenolblau, 15 % β-Mercaptoethanol; pH 6.8

2.1.4 Eingesetzte Primer und Plasmide

In den PCR-Transgenitätstests und den Sequenzierungen wurden die unten genannten Primer eingesetzt.

Tab. 1 In dieser Arbeit eingesetzte PCR-Primer und Plasmide

Primer	Basensequenz (5'-3')
LacZ-FW	ATCCTCTGCATGGTCAGGTC
lacZ-Rev	CGTGGCCTGATTCATTCC
hAng2RTF2	GGAAGAGCATGGACAGCATAGGA
hAng2RTRev2	GCCATTTGTGGTGTGTCCTGATT
PLAP-FW	CGAGCAAAGATCAGGTCAGCC
PLAP-Rev	TTGGTTGACAGAGTAGGGGC

PCR	Denaturierung	Zyklus: Denaturierung Annealing Elongation				Elongation
LacZ	4min. 94°C	30x:	30s 94°C	45s 60°C	45s 72°C	4min. 72°C
hAng2	5min. 94°C	30x:	45s 94°C	45s 63°C	60s 72°C	8min. 72°C
PLAP	4min. 94°C	30x:	30s 94°C	45s 60°C	50s 72°C	6min. 72 °C

Plasmid	Charakteristik
placZ	lacZ-Cassette aus pβ-actinPSDKLacZpA in pBKSII (+)
pLXSN	Fa. Clontech retroviraler Expressionsvektor / <i>Moloney murine leukemia virus</i> (MoMLV)
pRCAS	Trägt Sequenz der Alkalischen Phosphatase der Plazenta (PLAP) (Ref.: Dr. H. Drexler)

Tab. 2 In dieser Arbeit eingesetzte Antikörper

Antikörper	Firma / Nr.	Tier	Spezifität	Konzentration
α-Angiopoietin-2 PK n-T.	R&D 623	Ziege	H	1-10µg/ml
α-Ziege-IgG PK	Dako 038 (101)	Kaninchen	Ig-Fc	1:2000

PK=Polyklonal; n-T.=N-Terminus; c-T.=C-Terminus; H=human; R=Ratte; M=Maus

2.2 Präparation der Versuchstiere

Bei den Ratten handelte es sich um männliche Wistar-Ratten der Fa. Charles River Laboratories, die zum Zeitpunkt der Injektionen 5 Wochen alt waren. Die verwendeten Mäuse gehören einer Mauslinie an, die als Transgen den 5' flankierenden Bereich des aP2-Gens gekoppelt an ein LacZ-Reportergen trägt [Tidhar et al. 2001]. Der Phänotyp dieser Tiere zeigt u.a. β -Galaktosidase-Expression in den Perizyten der Netzhaut. Diese Tiere werden in dieser Arbeit zur Vereinfachung als „PlacZ-Mäuse“ bezeichnet. Die Anästhesie der Tiere erfolgte per Inhalationsnarkose mit Isofluran.

2.2.1 Intravitreale Injektion von retroviralen Vektoren

Durch intravitreale Injektion von retroviralen Expressionsvektoren ist es möglich, eine stete Expression eines bestimmten Proteins innerhalb der Netzhaut zu erreichen. Ein eleganter Weg, mit geringer Manipulation des Auges einen gleichmäßig hohen Spiegel an Angiopoietin-2 in einem bestimmten Gewebe zu erzeugen.

Die zuvor in der Zellkultur produzierten Virusüberstände können in einem bestimmten Zeitfenster abgenommen, mittels Ausschlußfiltration aufkonzentriert und anschließend injiziert werden. Hierzu wird mit Hilfe einer sterilen Hamiltonspritze 10 μ l virushaltiger Überstand im Bereich der *ora serrata* seitlich durch die Sklera in den Bulbus gespritzt. Es werden pro Injektion (10 μ l) bis zu 470.000 retrovirale Vektoren appliziert. Die von den GP+E86-Zellen produzierten ecotropen Viren können ihre spezielle Nagetier-Zielzelle nur ein einziges mal infizieren. Nach reverser Transkription im Cytosol integriert die Virus-DNA in das Wirtsgenom und kann anschließend exprimiert werden. Der 5'-LTR enthält Sequenzen, die dazu als Promotor dienen.

2.2.2 Entnahme und Präparation der Netzhaut

Zur Entnahme der Augen werden die Tiere getötet, die Bulbi nach Durchtrennung der äußeren Augenmuskulatur und des *Nervus opticus* entnommen und zur besseren Fixation mit Hilfe einer Kanüle seitlich ein Löchlein gestochen. Die so manipulierten Augen ruhen für 48 h in einer 2 % Para-Formaldehyd Lösung. Die Freipräparation der Retina erfolgt unter Zuhilfenahme einer Stereolupe in PBS-Lösung. Am Eintritt des *N. optici* wird in den *Bulbus oculi* ein zentrifugal verlaufender Sternschnitt gesetzt, der auf Höhe des Pigmentepithels die Abtrennung der Retina von der Choroidea erlaubt. So erhält man nach Abziehen der Ader-

und Lederhaut die dem Glaskörper bzw. der Linse anhaftende Netzhaut. Durch geschicktes Scheren der Strukturen lässt sich letztlich die Retina isolieren (s. Abb. 12). Alternativ kann durch Inzision und anschließender Zircumzision in Höhe der *ora serrata* Hornhaut, Linse und Glaskörper von der Netz-, Ader- und Lederhaut getrennt werden. Mittels einer stumpfen Flachsonde wird die Retina anschließend von der äußeren Augenwand in Höhe des Pigmentepithels isoliert und entnommen. Vorteil dieser Methode ist eine geringere Spannung innerhalb der Retina. Bei kleinen Bulbusdurchmessern ist dies bei der Digestion von Vorteil, da sich die Netzhaut auf dem Objektträger besser spreiten lässt. Allerdings geht bei dieser Art von Präparation ein Teil der Kapillarfläche verloren, da die Retina ja nicht *in toto* entnommen wird.

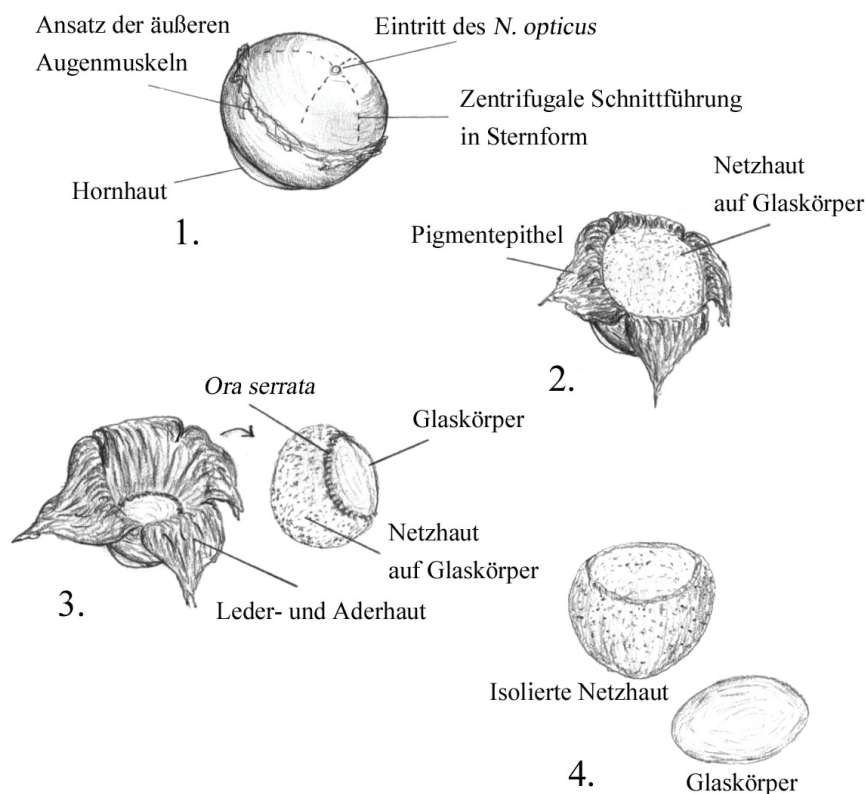


Abb. 12 Methoden zur Entnahme der Netzhaut aus dem fixierten Auge

Zeichnerisch dargestellt ist die chronologische Abfolge der Freipräparation einer fixierten Netzhaut. **1.** Ausgangssituation vor Eröffnung der Leder- und Aderhaut. **2.** Darstellung der dem Glaskörper aufliegenden Netzhaut durch zentrifugale Schnittführung, ausgehend vom Eintritt des N. opticus. **3.** Entnahme der Netzhaut mit dem Glaskörper durch stumpfes Präparieren. **4.** Befreiung der Netzhaut vom Glaskörper entlang der *ora serrata*.

2.2.3 Enzymatische Netzhaut-Digestion

Zur Darstellung der Gefäß- und Kapillarbetten einer Retina wird das um die Gefäße liegende Gewebe enzymatisch entfernt. Hierzu wird die fixierte Netzhaut in PBS gewaschen und anschließend für 1h in H_2O_{dd} bei 37 °C inkubiert. Es folgt die Abtrennung eventueller Glaskörperreste mit einer Pinzette. Nach Überführung der Retina in eine 5% Pepsin-Lösung (Fa. Merck, 37°C, pH=1,27) wird nach einer bestimmten Inkubationszeit (20-30 min) begonnen, die sich bereits lösende Photorezeptorzellschicht durch leichtes Bestreichen mit einer Sonde zu entfernen. Anschließend folgt eine Behandlung der Retina mit einer 2,5% Trypsin-Lösung (Fa. Difco, 37°C, pH=7,6) für 15 min. Es trennen sich nun die restlichen Gewebsschichten von den Gefäßen. Die Netzhaut wird vorsichtig auf einen Objektträger überführt. Durch peripheres Betropfen der Retina mit destilliertem Wasser werden mechanisch noch verbleibende Zellreste abgetrennt. Die überschüssige Flüssigkeit wird mit Abstand zum Objekt vorsichtig abgesaugt. Eventuell muß noch mehrmals mit Trypsin-Lösung inkubiert werden, um die Kapillarbetten einigermaßen frei von Zellresten darstellen zu können. Das Gefäßnetz des Auges wird auf dem Objektträger mit Hilfe des beschriebenen Tropfens und Saugens ausgespreitet und luftgetrocknet. Am Folgetag führt man eine PAS-Färbung durch. Die Konzentrationen der Trypsin- und Pepsin-Lösungen sowie die Inkubationszeiten müssen für jede Enzym-Charge neu ermittelt werden.

2.2.4 PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)

Um das Verhältnis Perizyten zu Kapillarfläche bzw. Endothelzellzahl für die Netzhautkapillaren bestimmen zu können, muß die zuvor enzymatisch digestierte Retina gefärbt werden. Hierzu eignet sich besonders die Perjodsäure-Schiff-Färbung.

Tab. 3 Vorgehensweise zur Durchführung einer PAS-Färbung

Medium	Verweildauer (Min.)
H_2O_{dd}	1
Perjodsäure 1%	5
Leitungswasser	7
H_2O_{dd}	2
Schiffssches Reagenz	20
Leitungswasser	15
H_2O_{dd}	0,2
Mayers Hämalan	7
Leitungswasser	10
H_2O_{dd}	2
Ethanol 60% 70%, 80% 90% 95% 100%	Je 2
Roticlear (Xylolersatz)	2 x 4
Eindeckeln mit Entellan	

Zur Auswertung der PAS-gefärbten Netzhaut-Digestionen wird je Netzhaut in mindestens 5 Gesichtsfeldern (Vergrößerung 600x) die Anzahl der Perizyten pro Kapillarfläche bestimmt und gemittelt. Die Auswertung erfolgt „blind“. Die Unterscheidung zwischen Perizyten und Endothelzellen wird aufgrund morphologischer Merkmale, dem Färbeverhalten in der PAS-Färbung und der Lage der Zellen vorgenommen. So sitzen die Perizyten auf den Endothelzellen auf und sind bevorzugt an Gabelungen des Kapillarnetzes zu finden (s. Abb. 13). Weiterhin sind die Kerne der Endothelzellen schmaler und länger als die Perizyten und treten niemals als „Doppelkern“ auf.

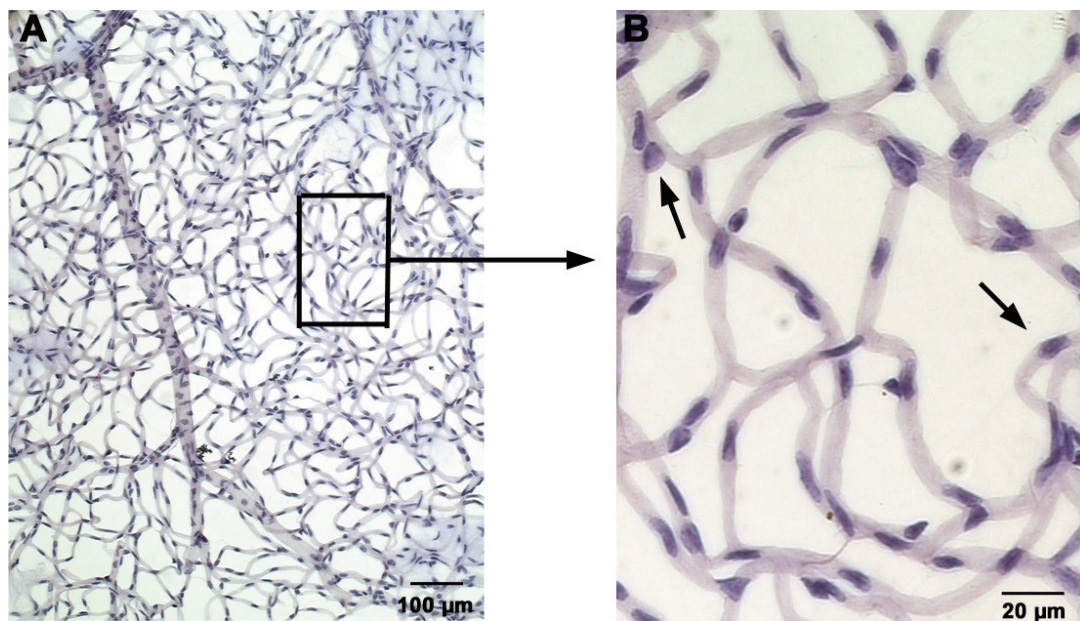


Abb. 13 Enzymatische Netzhautdigestion mit anschließender PAS-Färbung

Die Abbildung zeigt das zweidimensionale Netzwerk der Netzhautgefäße. **A)** Überblick über die Gefäßstrukturen der Retina. Die Kapillarnetze sind in ihrer Dichte homogen; die Gefäße zeigen deutlich hierarchischen Aufbau. **B)** Vergrößerung aus A: Die Pfeile markieren Perizyten.

2.2.5 PLAP-Färbung der Ratten-Netzhaut

Die fixierte und entnommene Netzhaut wird sorgfältig von Glaskörperresten befreit und bei 4°C für 10 min in PBS/MgCl₂ gewaschen. Es folgt die Inaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatase bei 65°C für 90-120 min. Anschließend inkubiert man die Retina bei RT für 10 min in XP-Detektionspuffer. Die eigentliche Darstellung der temperaturresistenten plazentalen alkalischen Phosphatase erfolgt durch Färben des Gewebes in XP-Reaktionspuffer für max. 90 min bei RT. Die Reaktion wird gestoppt, indem die Retina 3x10 min mit PBS/20mM EDTA behandelt wird. Zur besseren Darstellung der gefärbten Zellen wird das Gewebe mit *Murray's Miracle Clear* behandelt. Hierzu wird die Netzhaut

zuerst in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend in *Murray's Miracle Clear* gewaschen, bis das Gewebe transparent erscheint.

Chemikalien:

XP-Detektionspuffer: 100mM Tris/HCl pH9.5

100mM NaCl

50mM Mg Cl₂

XP-Reaktionspuffer: 50µl XP-Stocklösung

100µl NBT-Stocklösung

in 5ml XP-Detektionspuffer

XP-Stocklösung: 100mg/ml 5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) in H₂O (-20°C)

NBT-Stocklösung: 50mg/ml nitroblau tetrazolium in 70% DMF / 30% H₂O (-20°C)

2.2.6 β -Galaktosidase Färbung der Netzhaut von „PlacZ-Mäusen“

Es wurde eine Mauslinie verwendet, die als Transgen den 5' flankierenden Bereich des aP2-Gens, gekoppelt an ein LacZ-Reportergen trägt [Tidhar et al. 2001]. Das Transgen wurde zufällig an einer Stelle des Maus-Genoms inseriert. Diese Insertions-Mutante trägt unvollständige 5'-Sequenzen des *adipose specific gene* (aP2) [Graves et al. 1991], gekoppelt an ein LacZ-Reportergen mit einem SV40 Kernlokalisationssignal (nls) [Fire et al. 1990]. Der Phänotyp dieser Tiere zeigt β -Galaktosidase-Expression in perivaskulären Zellen und somit auch in den Perizyten der Netzhaut. Zur Vereinfachung werden diese Tiere im folgenden als „PlacZ-Mäuse“ bezeichnet.



Abb. 14 Der genetische Hintergrund der PlacZ-Insertions-Mutanten

Die integrierte DNA-Sequenz der PlacZ-Mäuse besteht aus *upstream*-Sequenzen des aP2-Gens (*adipose specific gene*) und einer LacZ-Expressionskassette. Begrenzt ist das Transgen von einer PstI bzw. einer NotI Restriktionsendonukleasen-Bindesequenz. Die grauen Boxen entsprechen Exons des Mausgenoms, der dicke Balken zeigt das Transgen.

Zur Färbung wird die isolierte Retina über Nacht in einer Färbelösung (1 Teil 2 % X-Gal-Stocklösung in DMF und 19 Teile LacZ-Färbelösung) bei 30 °C inkubiert. Durch

mehrmaliges peripheres Einschneiden ist es anschließend möglich, die halbkugelförmige Netzhaut in eine annähernd plane Form zu bringen. So lässt sich die Retina nach Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ problemlos auf einen Objektträger überführen und mit Aquatex wässrig eindeckeln.

β -Galaktosidase- (LacZ-)Färbelösung:

5 mM Kaliumhexacyanoferrat

5 mM Kaliumhexacyanoferrit

2 mM Magnesiumchlorid (Hexahydrat)

20 μl P40 10%

0,01g Natriumdeoxycholat

frisch hinzu: 1/20 Volumen X-Gal (2%) in DMF

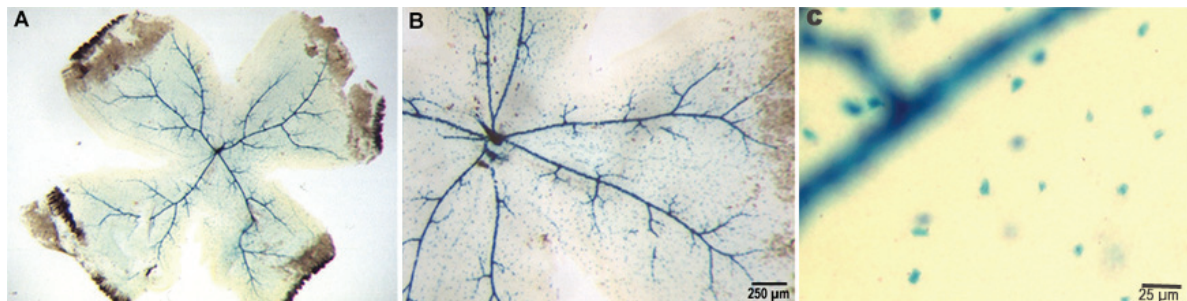


Abb. 15 β -Galaktosidase-Gesamtfärbung der Netzhaut einer PlacZ-Maus

Zu erkennen sind die aufgrund der LacZ-Färbung blau gefärbten Perizyten, die indirekt die Gefäße markieren. **A)** Gesamtübersicht über eine Netzhaut. Zu erkennen sind die Gefäßverläufe der vier großen Arterien und deren Austritt aus der Zentralarterie. Die Netzhaut ist zur besseren Präparation kleeblattförmig eingeschnitten. **B)** In dieser Vergrößerung erkennt man deutlich die Perizyten der größeren Gefäße und die dazwischen liegenden einzelnen Perizyten der tieferen Kapillarnetze. **C)** Diese Aufnahme zeigt detailliert den Perizytenbesatz auch der kleineren Gefäße.

Zur Bestimmung des Perizytenbesatzes einer Netzhaut werden pro Retina bei 400 x Vergrößerung in mindestens 10 Gesichtsfeldern die Anzahl der Perizyten des tiefen Kapillarnetzes und der oberflächlichen Gefäße ausgezählt und gemittelt.

2.3 Bearbeitung von Nukleinsäuren

2.3.1 Der retrovirale Expressionsvektor „pLXSN“

Um die Wirkung eines bestimmten Proteins *in vivo* zu studieren oder dieses als Therapeutikum einzusetzen, kann man seine kodierende DNA über einen retroviralen Vektor in das Zielgewebe einschleusen.

2.3.2 Klonierung von retroviralen Vektoren

Um herauszufinden, ob retrovirale Vektoren überhaupt die qualitative und quantitative Potenz besitzen, Zellen der Retina zu infizieren, wurde ein Vektor kloniert, der für ein Reporter-Protein kodiert. Die Klonierung wurde nach folgendem Muster durchgeführt:

- Transformation von Plasmid-DNA in KCM-kompetente E.coli Bakterien
- Extraktion und Aufreinigung der DNA, analytischer Restriktionsverdau, anschließend „Maxi-Prep“ (Amplifikation der Vektor- bzw. Insert-tragenden Plasmide)
- Extraktion und Aufreinigung der DNA sowie präparativer Restriktionsverdau zur Gewinnung eines Vektors (retroviral) bzw. eines Inserts (z.B. Reportergen-Sequenz)
- Isolierung und Aufreinigung des Vektors und des Inserts
- Ligation des Vektors mit dem Insert
- Isolation und Aufreinigung des kompletten Plasmids und erneute Transformation in KCM-kompetente E.coli Bakterien
- Extraktion und Aufreinigung der DNA, analytischer Restriktionsverdau, anschließend „Maxi-Prep“ (Amplifikation des fertigen retroviralen Vektors)
- Extraktion und Aufreinigung der Plasmide, Bestimmung der DNA-Konzentration
- analytischer Restriktionsverdau und Sequenzierung zur Sicherung der korrekten Insertorientierung

Die DNA des replikationsinkompetenten Vektors wurde anschließend mittels Calciumphosphat-Präzipitation in eine Verpackungszelllinie transfiziert. Die DNA-Sequenz des humanen Angiopoietin-2 wurde von der Fa. Regeneron bezogen, die Sequenz der alkalischen Phosphatase aus der Plazenta (PLAP) entstammt einem Plasmid (pRCAS), das freundlicher Weise von Herrn Dr. Hannes Drexler zur Verfügung gestellt wurde. Die Details der Konstrukte sind der **Abb. 19** zu entnehmen.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Saiki et al. 1988] dient der exponentiellen Amplifizierung und somit dem Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes. Ist ein bestimmtes Transgen die Zielsequenz, kann folglich mittels der PCR die Transgenität eines Tieres nachgewiesen werden. Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird durch den Einsatz von speziellen synthetischen Oligonukleotid-*Primern* definiert, die den zu vervielfältigenden

DNA-Bereich flankieren. In mehreren Reaktionszyklen unterschiedlicher Temperatur wird die doppelsträngige DNA denaturiert, die *Primer* an die Nukleinsäure hybridisiert und durch die thermostabile *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, Fa. Promega) elongiert.

Im Rahmen der Studien mit den PlacZ-Mäusen ist es notwendig zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Tiere transgen sind. Zum Nachweis der integrierten Fremd-DNA wird eine PCR durchgeführt, in der spezifische *Primer* (s. **Tab. 1**) eingesetzt werden, die ausschließlich die Sequenz des jeweiligen Transgens erkennen. Im positiven Falle resultiert eine spezifische Bande, die jenen Bereich repräsentiert, der durch die *Primer* „eingeschlossen“ wird. Die zu analysierende genomische Maus-DNA wird durch Lyse der Schwanzspitze mit Proteinase K in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß gewonnen. Das Gewebe wird hierzu in 500 µl PCR-Ready-Lysis-Puffer (50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl; pH 8.3; 0.45 % NP-40; 0.45 % Tween 20) und 4 µl Proteinase K (20 µg/µl) für 6 h bei 55 °C unter Schütteln lysiert. Nach Inaktivierung der Proteinase bei 95 °C für 15 Minuten wird kurz zentrifugiert. Von dem die genomische DNA enthaltenden Überstand wird 1 µl zu 19 µl Reaktionsmix gegeben. Dieser besteht aus 2 µl 10 x PCR-Puffer, 1.2 µl MgCl₂ 25mM, 0.8 µl dNTPs 5 mM, 0.13 µl lacZ-Primer *forward* + *reverse* 100 pmol, 0.2 µl *Taq*-Polymerase 5U/µl und 14,54 µl H₂O_{dd}. In einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß kann die Reaktion in der PCR-Maschine gestartet werden. Die PCR erfolgt nach dem in **Tab. 1** angegebenen Schema. Über eine analytische Agarose-Gelelektrophorese kann im positiven Falle das PCR-Produkt nachgewiesen werden.

2.3.4 Gelelektrophoretische Größenfraktionierung von DNA-Fragmenten

Das Prinzip der Gelelektrophorese basiert auf der unterschiedlich schnellen Wanderung verschieden großer DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix. Die negativ geladene DNA wandert dabei zur Anode. Die Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle entscheidet über die Konzentration der Gelmatrix. Gemische kleinerer Moleküle lassen sich mit höherprozentigen Gelen besser fraktionieren. Bei gleichzeitigem Auftrennen eines Markers können die ungefähren Größen der resultierenden Fragmente bestimmt werden. Die Auftrennung verschieden großer DNA-Moleküle wird zum Ende eines präparativen oder analytischen Restriktionsverdaus durchgeführt, um die gewünschte DNA im Anschluß isolieren zu können oder aufgrund des DNA-Fragmentmusters Aussagen über die im geschnittenen Plasmid enthaltenen Restriktionsschnittstellen treffen zu können. Ein analytischer Verdaus dient somit zur Kontrolle einer zuvor durchgeführten Klonierung. Die Existenz und Orientierung einer bestimmten Basensequenz innerhalb eines Plasmids kann

nachgewiesen werden. Auch können die in einer PCR amplifizierten DNA-Sequenzen unter Verwendung eines Agarosegels aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Je nach verwendeter Gelkammer werden in 100 ml bis 400 ml 0.5 x TBE 1 % Agarose durch mehrfaches Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wird 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gellösung hinzugegeben und durch Schwenken gemischt. Nach dem Gießen in eine Flachbettgelkammer wird ein Kamm gesteckt. Nach Aushärten wird mit 0.5 x TBE Laufpuffer überschichtet und die DNA mit Ladepuffer in die Taschen pipettiert, wobei eine Menge von 5 µg/cm Taschenbreite nicht überschritten wird. Die angelegte Spannung richtet sich nach der Fragment- und Gelgröße und liegt zwischen 30 V und 200 V. Das DNA-Bandenmuster läßt sich durch kurzzeitige Auflage des Gels auf eine UV-Quelle (314 nm) darstellen, da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und durch die UV-Strahlung zur Fluoreszenz angeregt wird. Eine Größenzuordnung und Mengenabschätzung ist durch Einsatz einer 1 kB-Leiter (Fa. Gibco) mit der Konzentration von 100 ng/µl möglich, wobei die 1,6 kB-Bande 1/10 der Gesamtmenge ausmacht.

2.3.5 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA gibt es verschiedene Methoden. Zum Entfernen von Pufferresten und Enzymen kann man eine Alkoholfällung oder Kieselgel-Adsorbtionschromatographie durchführen, hochreine DNA erhält man mittels Anionen-Austauschchromatographie.

2.3.5.1 Elution und Reinigung von DNA aus Gelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente können aus der Gelmatrix je nach Fragmentgröße auf verschiedene Weisen isoliert und gereinigt werden, wobei bestimmte Methoden nur für die Aufreinigung von Molekülen bis zu einer bestimmten Größe geeignet sind. So ist bei der Adsorbtionschromatographie eine quantitative Bindung von Molekülen über 7 kB an die Kieselgelmatrix nicht mehr möglich. Zur Reinigung von Fragmente bis 7 kB aus Agarosegelen wird nach Auftrennung und Ausschneiden der gewünschten DNA der Gelblock, der die Nukleinsäure enthält, durch ein chaotropes Salz aufgelöst. Anschließend kann die DNA über eine Kieselgel-Adsorbtionschromatographie aufgereinigt werden. Dies geschieht mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Fa. QIAGEN. (Soll eine noch intensivere Reinigung erfolgen, wird eine Anionen-Austauschchromatographie durchgeführt [s. 2.3.5.3]).

2.3.5.2 Kieselgel-Adsorbtionschromatographie

Diese Methode wird zur Entfernung von Enzymen wie z.B. DNA-Polymerasen oder Restriktionsendonukleasen aus einem Reaktionsansatz genutzt. Unter Hochsalzbedingungen

binden Nukleinsäuren an eine stationäre Phase aus Kieselsäure. Zur Elution wird die gebundene DNA mit einer gering konzentrierten Salzlösung (H₂O oder T0.1E) ausgeschwemmt. Das QIAquick PCR Purification Kit der Fa. QIAGEN beruht auf dieser Methode; es kommen QIAquick Spin-Säulen aus Kieselsäure zum Einsatz.

2.3.5.3 Anionen-Austauschchromatographie

Diese Methode verwendet Säulenfüllmaterial, das im sauren Milieu positiv geladene Gruppen enthält. Das Gegenion der Säulenmatrix kann unter Niedrigsalzbedingungen im Austausch gegen die ebenfalls negativ geladene DNA ausgewechselt werden, so daß die DNA an die Säule gebunden wird. Nach Waschen der Säule mit einem Niedrigsalzpuffer kann die DNA wieder mit einem Hochsalzpuffer eluiert werden. Die anschließende Isopropanolfällung liefert von Salzen befreite DNA. Diese Aufreinigungsmethode liefert hochreine DNA, die z.B. für Pronukleusinjektionen bei der Herstellung transgener Mäuse verwendet wird. Das Midi/Maxi Plasmid Purification Kit der Fa. QIAGEN beruht u.a. auf dieser Methode; es kommen QIAGEN-Tip-20 oder Tip-100 Säulen zum Einsatz.

2.3.5.4 Alkoholfällung

Eine Ethanolfällung wird vorgenommen, wenn DNA von störenden Pufferresten oder Lösungsmitteln befreit werden soll. Auch eine Konzentrierung ist so möglich. Die Aufnahme der gesamten, in einem Versuch verwendeten DNA im identischen Lösungsmittel zur Schaffung geeigneter Versuchsbedingungen setzt ebenfalls die DNA-Fällung voraus. Hierzu werden 0.11 Volumenteile 3M NaCH₃CO₂ (pH4.8) und 2.5 Volumenteile 100% Ethanol zu der DNA-Lösung gegeben und gemischt. Nach zwei bis zwölfstündiger Inkubation bei -20 °C wird bei 13.000 U/min 60 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wird mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen, angetrocknet und in der entsprechenden Menge T0.1E aufgenommen. Statt Ethanol kann auch Isopropanol eingesetzt werden. Die Fällung erfolgt dann bei RT. Allerdings werden nicht 2.5 Volumenteile sondern nur 1 Volumenteil eingesetzt, so daß das Volumen während der Fällung gering gehalten werden kann. Diese Methode kommt besonders nach Anionen-Austauschchromatographien zum Einsatz.

2.3.6 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA werden *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-*blue* mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert und in Flüssigkultur vermehrt (s. 2.5). Zur

Gewinnung der DNA wird eine alkalische Lyse sowie eine nachfolgende Alkoholfällung durchgeführt.

2.3.6.1 Präparation von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken

Am Vorabend der Präparation werden 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit der entsprechenden Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Morgen werden etwa 1.5 ml der Übernacht-Kultur in ein 2.0 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute bei 13000 U/min und RT zentrifugiert. Das erhaltene Pellet (Bakteriensediment) wird in 100 µl gekühltem Resuspensionspuffer (50 mM Tris, pH 8.0; 10 mM EDTA) aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer (200 mM NaOH; 1 % SDS) wird sofort kurz geschüttelt und schließlich 150 µl gekühlter Neutralisationspuffer (3 M KCH₃CO₂, pH 4.8) hinzugefügt und wiederum gemixt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wird für 10 Minuten bei 13.000 U/min und RT zentrifugiert und 350 µl des so erhaltenen Überstands in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in das bereits 800 µl Ethanol vorgelegt sind. Nach erneutem Schütteln wird erneut für 10 Minuten bei 13.000 U/min und RT zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wird mit 500 µl 70 % Ethanol gereinigt. Nach kurzem Antrocknen wird die DNA in 50 µl BERT-Puffer (0.1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml RNaseA in TE) aufgenommen. Ein Teil der erhaltenen DNA (5 µl) kann in den folgenden Restriktionsverdau eingesetzt werden.

2.3.6.2 Amplifizierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA Mengen werden 50 ml („Midi“-Präp) bzw. 150 ml („Maxi“-Präp) einer Übernachtskultur mittels des QIAGEN Midi- und Maxi-Plasmid Purification Protokolls aufgereinigt. Im wesentlichen beruht die Reinigung auf alkalischer Lyse der Bakterien, einer Anionen-Austauschchromatographie und einer abschließenden Isopropanolfällung. Die nach der Ethanolwäsche angetrocknete DNA wird in 200 µl T0.1E aufgenommen.

2.3.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.3.7.1 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA an bestimmten, meist palindromischen Sequenzfolgen von 4-8 Bp spalten und zu *sticky-* (mit Nukleotidüberhang) oder *blunt-ends* (ohne Nukleotidüberhang) führen. Die jeweiligen Reaktionen erfolgen unter den vom Hersteller angegebenen optimalen Pufferbedingungen bei

37 °C. Die Inkubationsdauer beträgt für analytische Verdaus 1h und für präparative Ansätze 2 h. Für eine erfolgreiche analytische Restriktion werden 0.5 µg DNA in 20 µl Reaktionsvolumen sowie 5 U der Nuklease eingesetzt, für präparative Zwecke wird entsprechend mehr DNA benötigt. Nach der Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von Ladepuffer gestoppt und über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.3.4). Abschließend wird bei einem präparativen Verdaus die DNA aus dem Gel eluiert und aufgereinigt (s. 2.3.5).

2.3.7.2 Ligation von DNA

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden erfolgt durch Inkubation mit der T4 DNA-Ligase des T4-Bakteriophagen. Das zu insertierende Fragment liegt hierbei in einem dreifach molaren Überschuß zum Vektorfragment vor. Über eine analytische Agarose-Gelelektrophorese lassen sich die Reinheit und das relative Mengenverhältnis der zu ligierenden Vektor- und Insertfragmente darstellen.

Es werden mindestens 100 ng DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgt im mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Bei 17 °C beträgt die Reaktionsdauer 6–12 h.

Als Negativkontrolle wird ein identischer Ansatz, allerdings mit H₂O anstelle der zu insertierenden DNA, zur Reaktion gebracht. Nach erfolgter Ligation wird ein Teil (5 µl) des Ligations- und des Kontrollansatzes direkt zur Transformation geeigneter Bakterien verwendet. Der Vergleich der nach Transformation und Ausplattierung resultierenden Kolonienzahlen beider Ansätze läßt Rückschlüsse auf eventuelle Religationen des (die Antibiotikaresistenz tragenden) Vektorfragments und somit unterbliebener Integration des Inserts zu.

2.3.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung von dsDNA-Konzentrationen wird die Absorbtion der jeweiligen Probe bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. Bei 260 nm wird die DNA-Konzentration, bei 280 nm der Proteinanteil bestimmt. Das Verhältnis beider Werte verdeutlicht den Reinheitsgrad der Probe. Als Bezugslösung dient der Puffer, in dem die DNA aufgenommen wurde. Um Meßfehler seitens des Gerätes auszuschließen, wird eine Standard-DNA-Lösung mit definierter Konzentration bei allen Messungen parallel gemessen. Eine ausreichende Reinheit der DNA, d. h. eine geringe Verunreinigung durch Proteine, liegt dann vor, wenn die Absorbtion bei 260 nm mindestens das 1.8-fache der Absorbtion bei 280 nm

beträgt. Die Konzentration errechnet sich nach der Formel: $c = Y \times OD_{260 \text{ nm}}$, wobei $Y = 50 \text{ µg/ml}$ (für Oligos: $Y = 33 \text{ µg/ml}$)

2.3.9 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA nach dem Dideoxy-Verfahren nach Sanger [Sanger et al. 1977] werden in einer enzymatischen Polymerisation neben unmarkierten dNTPs auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt. Der durch den Einbau dieser ddNTPs bewirkte Kettenabbruch der Polymerase-Reaktion führt zu unterschiedlich großen DNA-Fragmenten. Diese werden mittels einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. In einem Ansatz werden vier verschieden fluoreszierende Substituenten eingesetzt, so daß die Basenfolge über einen automatischen Sequenzierapparat ermittelt werden kann. Zum Einsatz kommen 0.5 µg Plasmid und 5 pmol des jeweiligen Primers.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Lösungen, Medien und verwendete Zelllinien

Es wurden folgende Medien bzw. Lösungen verwendet: DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium mit 4500 mg/ml Glucose, Fa. Gibco BRL); FCS (fetales Kälberserum, Fa. PAA-Laboratories); Pen/Strep (10.000 IU Penicillin und 10.000 µg Streptomycin je ml , Fa. HyClone); Glutamin (200 mM , Fa. HyClone); β -Mercaptoethanol-Lösung ($1/250.000$ in DMEM); NEAA (nicht essentielle Aminosäuren, Fa. Amimed); Trypsin/EDTA-Lösung (0.5 g/l Trypsin und 0.2 g/l EDTA; Fa. PAA-Laboratories); Pyruvat (100 mM $\text{NaCH}_3\text{COCO}_2$, Fa. Amimed).

Tab. 5 In Kultur gehaltene Zelllinien:

Zelltyp	Kurzbezeichnung	Referenz
GP+E86	Verpackungszelllinie	[Markowitz]
NIH-3T3	Murine immortalisierte Fibroblastenzelllinie (NIH 3T3 CRL-1658)	ATCC

Tab. 6 Verwendete Medien:

Zelltyp	Basis	Serum	Pen/Strep	Glut.	β -ME	NEAA	Pyruvat
GP+E86 NM	DMEM+	FCS	1% VT	1%	+	1%	1%
GP+E86 SM	s.o., + Neomycin-Analogon (G418): 1 mg/ml						
3T3 NM	DMEM+	FCS	1%	1%	+	1%	1%
3T3 SM	s.o., + Neomycin-Analogon (G418): 1 mg/ml						

NM= Normalmedium, SM= Selektionsmedium

2.4.2 Die Verpackungszelllinie „GP+E86“

Die Verpackungszelllinie „GP+E86“ [Markowitz et al 1988] exprimiert die retroviralen Strukturproteine, welche dem Vektor zur Replikation fehlen, besitzt aber nicht das ψ -Verpackungssignal. Somit können nur diejenigen Verpackungszellen infektiöse Viruspartikel synthetisieren, die erfolgreich mit der retroviralen Vektor-DNA transfiziert wurden. Nach erfolgreicher Transfektion beginnt die Verpackungszelllinie mit der Virusproduktion und die Viruspartikel reichern sich im Zellüberstand an. Es wurden pro viralem Konstrukt mehrere Klone einer Verpackungszelle isoliert und passagiert. Durch einen Titertest (s.u.) konnten diejenigen Klone identifiziert werden, die den höchsten Virustiter produzierten und dennoch weiterhin kontakthinhibiertes Wachstum zeigen.

2.4.3 Haltung und Vermehrung von eukaryotischen Zellen

Zur Vermehrung der in **Tab. 5** aufgeführten Zelllinien werden die Zellen in Gewebekulturschalen oder Flaschen bei 37 °C unter CO₂ Begasung (7 %) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre unter entsprechendem Wachstumsmedium gehalten. Sind die Zellen konfluent gewachsen, so werden sie unter einer Sterilbank zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. Amimed) pro 75 cm² hinzugegeben. Das Ablösen der Zellen wird unter dem Mikroskop kontrolliert und die Reaktion nach vollständiger Vereinzelung der Zellen durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen werden die Zellen bei 250 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und einer bestimmten Verdünnung (1:3 bis 1:6) ausgesät.

2.4.4 Lagerung von eukaryontischen Zellen

Zur Langzeitlagerung von eukaryontischen Zellen werden subkonfluente Zellen wie oben beschrieben behandelt. Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellsediment wird pro 75 cm² in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in Einfriergefäße überführt. Zu 1 ml dieser Zellsuspension werden 100 μ l Dimethylsulfoxid (Fa. Merck) gegeben und die Gefäße anschließend entweder in Zellstoff eingewickelt und bei -80°C eingefroren oder in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox der Fa. Nalgene überführt und ebenfalls bei -80 °C \ddot{U} N eingefroren. Am nächsten Tag werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Sollen in Stickstoff gelagerte Zellen aufgetaut werden, wird das Einfriergefäß in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut und die Zellen in 10 ml frischem Wachstumsmedium aufgenommen.

Nach einer Zentrifugation bei 250 x g für 5 min wird das Zellsediment mit frischem Wachstumsmedium resuspendiert und in die gewünschten Gefäße ausgesät.

2.4.5 Stabile Transfektions mittels Calciumphosphat-Kopräzipitation

Bei einer stabilen Transfektion wird DNA, die u.a. ein G418-Resistenzgen trägt, in eukaryontische Zellen eingeschleust. Anschließend wird eine Selektion mit G418 vorgenommen, so daß nur die erfolgreich transfizierten Zellen überleben. Im Gegensatz zur transienten Transfektion, bei der ein Maximum an Expression nach 36 h bis 72 h zu erwarten ist, exprimieren stabil transfizierte Zellen die exogene DNA konstant. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen 50 % konfluent sein. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz kann zusätzlich ein Plasmid transfiziert werden, das die cDNA des *Green Fluorescent Protein* (GFP) trägt. Ist die Transfektion erfolgreich abgelaufen, so lassen sich unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierende Zellen ausmachen.

In dieser Arbeit wurden GP+E86-Zellen einer eukaryontischen Verpackungszelllinie mit dem jeweiligen retroviralen Vektor-Plasmid durch Calciumphosphat-Kopräzipitation transfiziert. Bei dieser Methode bildet die zu transfizierende DNA mit Calciumphosphat ein Präzipitat, das sich auf der Zelloberfläche niederschlägt und nachfolgend aufgenommen wird. 24 h vor der Transfektion wird eine 90 % konfluente PD100 Gewebekulturschale 1:6 in die erforderliche Anzahl von PD60 Schalen aufgeteilt. Dabei werden 5 ml Medium pro Schale berechnet. Am Tag der Transfektion wird 3h zuvor das alte Medium durch neues ersetzt, indem das alte Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 4 ml neues Medium pro Schale hinzu gegeben wird. Die Transfektion beginnt mit der Verdünnung von 10 µg DNA in einem Volumen von 160 µl H₂O pro Schale. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wird hierzu 18 µl 2.5 M CaCl₂ gegeben und durch hoch und runter Pipettieren gemischt. Nach einer 10 min Inkubation wird 179 µl einer 2 x BBS-Lösung (= 50 mM BES pH 6.95; 280 mM NaCl; 1.5 mM Na₂HPO₄) hinzugegeben und unverzüglich für 20s durch Schnipsen mit dem Finger gemischt. Die Zellen stehen nun nochmals für 20 min ruhig bei RT. Die inkubierte Lösung wird anschließend tropfenweise auf die Zellen geträufelt. Die Platten inkubieren ÜN bei 3 % CO₂ und 37 °C (alternativ kann zur Aufnahme des Präzipitats auch ein Glycerolschock durchgeführt werden). Zum Entfernen des Präzipitats folgt ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS. Nach Zugabe von 5 ml neuem nichtselektiven Medium pro Schale werden die Platten für 48 h bei 7 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Abschließend passagiert man die Zellen in verschiedenen Verdünnungen in Selektionsmedium.

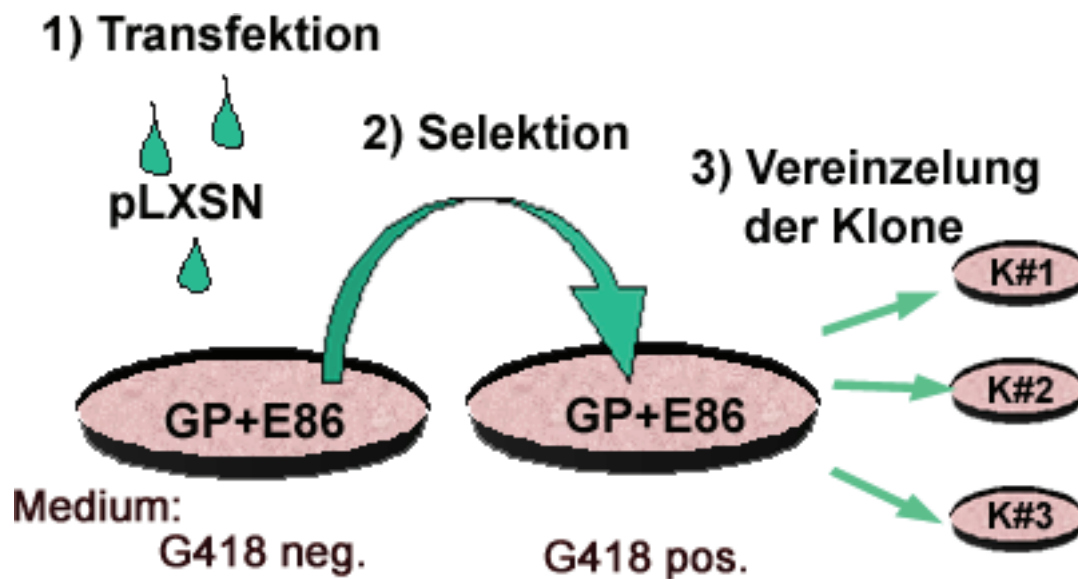


Abb. 17 Schema zur Erzeugung von virusproduzierenden Zellklonen

Aus Sicherheitsgründen liegen die Informationen zur Synthese infektiöser Retroviren getrennt von einander vor (s. Text). Daher muß zur Erzeugung funktioneller Retroviren die Plasmid-DNA des Vektors in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden (1). Hierdurch erhalten die Zellen eine G418-Resistenz. Anschließend werden die resistenten Zellen selektiert (2) und einzelne Klone isoliert (3).

2.4.6 Isolierung von transfizierten Verpackungszell-Klonen

Die zuvor transfizierten GP+E86 Verpackungszellen bilden nach Selektion in G418-haltigem Medium Kolonien von Zellklonen aus. Zur Vereinzelung eines Klones wird mit einer Pasteurpipette Trypsin-Lösung angesaugt und dann vorsichtig auf eine Kolonie aufgesetzt. Durch leichtes Ein- und Ausspülen von Trypsin werden die Klone von der Schale gelöst und können in eine 24-Loch-Platte überführt werden. Sind die Zellen unter Selektion zu einem dichten Zellrasen gewachsen, können sie in eine 6-Loch-Platte überführt werden. Sind auch diese dicht gewachsen, werden die Zellen mit Trypsin gelöst, abzentrifugiert und eingefroren, bzw. in eine PD60 Schale überführt.

2.4.7 Bestimmung des Virustiters

Um herauszufinden, welcher Zellklon die höchste Produktionsrate an Viren besitzt, kann ein Titertest durchgeführt werden. Prinzip hierbei ist die Infektion von Maus-Fibroblasten (NIH-3T3) durch den Überstand der transfizierten Verpackungszell-Klone (GP+E86) *in vitro*. Je nach Virus-Konzentration resultiert eine mehr oder weniger hohe Anzahl infizierter Fibroblasten, die aufgrund der erworbenen Resistenz gegen G418 in Selektionsmedium überleben und Kolonien bilden können. Nach Auszählen dieser Kolonien und Hochrechnen läßt sich die Konzentration von CFU (*colony formin units*, = Viren) bestimmen. Im einzelnen

wird 24h vor der Infektion das Selektionsmedium der GP+E86-Zellen gegen frisches, nicht-selektives Medium ausgetauscht und die Fibroblasten 1:15 in PD60 Schalen gesplittet. Am Tag der Infektion wird der GP+E86-Überstand zuerst filtriert, um darin befindliche Zellen zu entfernen. Nun werden 10 µl Überstand (ÜS) 1:100 mit 990µl nicht-selektivem Medium (NSM) verdünnt. Von diesem Gemisch werden zum einen 50µl ÜS mit 10µl Polypren (8µg/ml) und 940µl NSM versetzt (=1:20 Verdünnung), zum anderen mischt man 500µl ÜS mit 10µl Polyprene (8µg/ml) und 490µl NSM (=1:2 Verdünnung). Der erhaltene Mililiter wird nun auf die zuvor vom Medium befreiten Fibroblasten gegeben und nach 2 Stunden 3ml NSM zur Verdünnung des Polyprens hinzugegeben. 48h später erfolgt die Selektion der Fibroblasten in G418-haltigem Selektionsmedium. Die Zellen in den PD60-Gewebekulturschalen werden hierzu 1:15 in PD100-Schalen passagiert. Nach mehreren Tagen zeigen sich einzelne Kolonien, die nun ausgezählt werden.

Formel zu Berechnung der Viruskonzentration im GP+E86-Überstand:

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Kolonienzahl (K)}}{2^T} = \frac{3.000 \text{ bzw. } 30.000 \cdot K}{8}$$

T= Teilungszyklen nach Infektion bis 1:15 Split

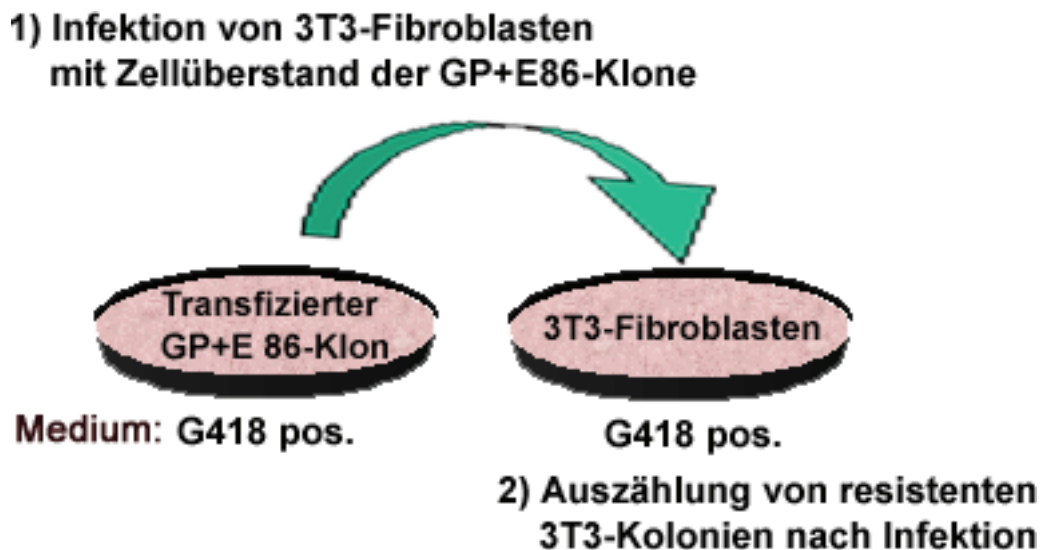


Abb. 18 Schema zur Testung der Viruskonzentration in den Zellüberständen

Um die Syntheseleistung einzelner Verpackungszellklone zu bestimmen, werden mit deren Zellüberständen Fibroblasten beimpft (1), die nach erfolgreicher Infektion eine G418-Resistenz erhalten und so selektioniert werden können. Durch Auszählung der Infizierten Zellen (2) lassen sich Rückschlüsse auf die ursprüngliche Viruskonzentration in den einzelnen Zellüberständen ziehen.

2.4.8 Konzentration des Virusüberstands durch Filtration

Um eine möglichst hohe Viruskonzentration in den Injektionsversuchen einsetzen zu können, wählt man für die Gewinnung von viralen Vektoren denjenigen GP+E86-Klon aus, der die höchste Produktionsrate an Viren besitzt. Zusätzlich wird der frisch entnommene Zellüberstand vor der Injektion durch Ausschlußfiltration aufkonzentriert. Man erreicht dadurch eine Konzentrationserhöhung um den Faktor 40; dies entspricht absoluten Werten von ca. $4 \cdot 10^7$ Viren / ml. Zum Einsatz kommt das Filtersystem „Macrosep Omega“ der Fa. Pall Gelman Laboratory mit einer Filter-Ausschlußgröße von 300 kD.

15ml des infektiösen Zellüberstands werden für 5min bei 700g zentrifugiert. Hiervon überträgt man 14,5ml auf das zuvor mit PBS durch Leerzentrifugation gewaschene Filtersystem. Bei anschließender Zentrifugation um 4.800g für 80min erfolgt die eigentliche Konzentration. Der so behandelte Überstand lässt sich auf Eis gekühlt einige Stunden bis zur Injektion aufbewahren und zeigt sogar noch nach Wochen hohe Infektiosität.

2.5 Bakterienkultur

2.5.1 Lösungen, Medien und verwendete Zelllinien

LB-Medium: 20 g LB-Broth (Fa. Gibco BRL) je Liter H₂O; autoklaviert.

LB-Agar: 1 l LB-Medium, 15 g Bacto-Agar (Fa. Difco); autoklaviert

1000 x Ampicillin: 100 mg/ml Ampicillin (Fa. Boehringer Mannheim) in H₂O; sterilfiltriert

Glycerinstock: 17.5 % Glycerin in LB-Medium

Für die Vervielfältigung rekombinanter DNA (Plasmid-DNA) wird der Stamm XL1-*blue* der Bakterienart *Escherichia coli* verwendet. Zur Selektion der nur die gewünschten Plasmide tragenden Bakterien tragen die Plasmide eine Antibiotikaresistenz (Ampicillinresistenz).

2.5.2 Transformation KCM-kompetenter Bakterien

Pro Transformation werden 100 µl KCM-kompetente (= chemisch kompetente) Bakterien benötigt. Die entsprechende Menge wird auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz gibt man eine kalte Lösung aus 20 µl 5 x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂), 75 µl H₂O und 5 µl der zu transfizierende DNA (~ 200 pg) zu den aufgetauten Bakterien. Nach Mischen wird der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei RT stehen gelassen. Es folgt die Zugabe von 1 ml 37 °C warmen LB-Medium und eine Inkubation für 1 h auf

einem Schüttler bei 37 °C. Anschließend werden 500 µl des Ansatzes auf eine LB/Amp⁺-Agarplatte ausplattiert und bei 37 °C ÜN im Brutschrank inkubiert.

2.5.3 Herstellung KCM-kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien lassen sich mit Hilfe eines bestimmten Salzgemisches (KCl, CaCl₂ und MgCl₂) mit der gewünschten DNA transformieren. Zur Herstellung KCM-kompetenter XL1-*blue* *E. coli* Bakterien werden 5 ml Amp⁺-LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ÜN bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 100 ml Amp⁺-LB-Medium werden anschließend mit 1 ml der ÜN-Kultur beimpft und wiederum bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD bei 600 nm von 0.5 – 0.6 erreicht ist. Nun werden die Bakterien in einem 50 ml Röhrchen bei 2500 g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wird anschließend in 7.5 ml TSB (5 % [v/v] DMSO, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 10 % [w/v] PEG 6000 in LB-Medium) resuspendiert. Nach Inkubation für 1 h auf Eis wird die Bakteriensuspension in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff Schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

2.5.4 Lagerung und Vermehrung

Die durch die Klonierungen gewonnenen Plasmide werden in Bakterien transformiert. Ein Teil dieser transformierten Bakterien oder der Abstrich eines Glycerolstocks wird auf eine Amp⁺-Agarplatte mit Hilfe einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Vermehrung eines Klons dieser Bakterien wird eine Kolonie von der Agarplatte gepickt und damit 5 ml LB/Amp⁺-Medium angeimpft. Diese wird wiederum über Nacht auf einem Bakterienschüttler mit 245 U/min bei 37 °C inkubiert. Das gelöste LB-Medium darf bei Zugabe des Ampicillins 50 °C nicht überschreiten, da das Antibiotikum ansonsten zerstört würde. Zur Lagerung der Plasmide wird 750 µl Bakterien-ÜN-Kultur mit 250 µl 70 % Glycerin versetzt (17.5 % Lösung) und sofort bei –80 °C als Glycerolstock eingefroren. Geeigneter ist jedoch die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien und die anschließende Lagerung bei –20 °C in geeignetem Puffer (T0.1E). Nach Auftauen der Plasmide können geeignete Bakterien mit der DNA wieder transformiert werden.

2.6 Immunologischer Proteinnachweis (Immunoblot / „Western Blot“)

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgt durch Einsatz von Antikörpern, die das nachzuweisende Protein erkennen und deren spezifische Bindung durch eine Enzymreaktion nachgewiesen werden kann. Hierzu wird die proteinhaltige Lösung zuerst mittels einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine anschließend mittels Elektro-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Fixiert auf dieser Membran können die Proteine wie beschrieben nachgewiesen werden.

Um zu zeigen, daß die retroviralen Vektoren nach Infektion einer Wirtszelle das gewünschte Protein exprimieren, wird ein oben beschriebener „Western Blot“ durchgeführt. Ausgangsmaterial ist zum einen der Zellüberstand von zuvor infizierten NIH-3T3-Fibroblasten und zum anderen das Lysat dieser Zellen.

2.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten (Zellyse)

Der zu analysierende Zellüberstand wird direkt in eine SDS-PAGE eingesetzt (s.u.). Die Lyse des Zellrasens erfolgt durch Waschen der Zellen mit PBS und anschließender Ernte mit einem Gummieschaber in Lysepuffer. Pro PD100-Gewebekulturschale rechnet man ca. 400µl Lysepuffer. Zusätzlich wird das Lysat mit Hilfe einer Kanüle durch mehrmaliges Aufziehen grob homogenisiert. Der Zelldetritus wird abzentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Proteine können nun mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. Alternativ kann der Zellrasen mit 2 x Lämmli-Auftragspuffer lysiert werden. Hierzu wird der Puffer mit frischem β -Mercaptoethanol (10%) versetzt und auf 95°C erhitzt. Mit einem Gummieschaber kann man die Zellen ernten und mit Hilfe einer Kanüle durch mehrmaliges Aufziehen ebenfalls grob homogenisieren. Das Gemisch wird nochmals für 5min auf 95°C erhitzt, bevor mit Hilfe einer Zentrifugation der Gewebedetritus vom Proteinextrakt abgetrennt wird. Der proteinhaltige Überstand kann nun weiterverwendet werden.

Lysepuffer (Proteinextraktion):

150mM NaCl,
0,2% Triton,
1mM EDTA,
30mM Tris pH 7.5,
Proteaseinhibitorencocktail Fa. Boehringer

2.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird u.a. zur Auftrennung von Proteingemischen verwendet. Durch die Denaturierung der Proteine wird eine Auffaltung der Tertiärstrukturen erreicht, die die Beladung der Proteine mit SDS ermöglicht. Hierdurch werden alle Proteine mit einer negativen Ladung versehen, so daß die gesamten Proteine unabhängig von ihrer Ausgangsladung je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell zur Anode wandern. Für eine optimale Fraktionierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 60 kDa – 200 kDa sind 5%ige Gele, für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 16 – 70 kDa 10%ige Gele geeignet. Das System besteht aus einem großporigen, 3%igen Sammelgel, das etwa 1/3 der gesamten Laufstrecke ausmacht. Die eigentliche Auftrennung erfolgt aufgrund der Masse der aufzutrennenden Proteine über ein engporiges, 10%iges Trenngel. Im Sammel- und Trenngel befinden sich Chloridionen, im Laufpuffer Glycin. Die Chloridionen wandern nach Anlegen der Spannung schnell zur Anode, während das Glycin nur langsam in das Sammelgel eindringt und sich nur langsam bewegt, da es bei pH 6.8 überwiegend als Zwitterion vorliegt. Zwischen Glycin und Chloridionen entsteht somit ein „ionenarmer“ Bereich, so daß die Proteine hier den Ladungstransport übernehmen. Je nach ihrem Molekulargewicht, das ihre elektrophoretische Mobilität bestimmt, ordnen sich die Proteine an und werden zugleich an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel konzentriert. Im Trenngel werden die Proteine von den Glycinionen überholt, da Glycin bei pH 8.8 negativ geladen ist. Es folgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Praktisch wird nach dem Einspannen der zuvor gereinigten Glasplatten in die Gelgießapparatur Mini-Protean II (Fa. BioRad) die Trenngellösung zwischen die Platten (73mm x 100mm) gegossen. Diese besteht aus 7,5% Acrylamid, 0.1% SDS (Natriumdodecylsulfat) und 1M Tris pH 8.8 in H₂O. Zum Aushärten werden 100 µl einer frischen 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) und 10 µl TEMED auf 10 ml Gelvolumen zugesetzt. Damit sich während des Aushärtens eine ebene Oberfläche bilden kann, wird die Gellösung sofort mit wässrigem Butanol oder H₂O_{dd} überschichtet. Nach erfolgtem Aushärten wird das Butanol bzw. das Wasser abgezogen und das Sammelgel pipettiert. Dies besteht aus 3 % Acrylamid, 1M Tris pH 6.8 und 0.1 % SDS. Nach Zusatz entsprechender Mengen TEMED und APS wird das Sammelgel gegossen und der Kamm gesteckt. Nach dem Aushärten wird das fertige Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, der Kamm gezogen, mit Laufpuffer nach Lämmli überschichtet und die Taschen gespült. Zu 20 µl Probe wird 1/6 Volumen 6 x Auftragspuffer nach Lämmli hinzugegeben und zur Denaturierung für

5 Minuten auf 95 °C erhitzt (alternativ kann zu dem Lämmli-Auftragspuffer 8M Harnstoff gegeben oder mit DTT denaturiert werden). Gleiches gilt für den Marker. Dieser besteht aus Molekülen bestimmter Größe, die nach der Auftrennung eine Größenzuordnung der aufzutrennenden Proteine zulassen. Es folgt das Auftragen der Proben und die Elektrophorese mit 100 V für 10 Minuten und anschließend mit 160 V bis zur vollständigen Auftrennung.

Reduzierender SDS-Probenpuffer (DTT-haltig):

Tris pH6,8	200mM
SDS	200mM
Glycerin	30%
DTT (frisch)	32 mM
Bromphenolblau	0,001%

2.6.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die über eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennten Proteine lassen sich mittels Elektro-Blotting leicht auf eine Nitrozellulosemembran überführen. Hier können einzelne Proteine über die Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Der erste Antikörper erkennt spezifisch das Protein (s. **Tab. 2**). An ihn bindet in diesem Fall der mit einer Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper. Die Peroxidase setzt ein bestimmtes Substrat unter Lichtemission um. Die Lichtemission schwärzt einen Röntgenfilm.

Das PAA-Gel wird nach Ausbau aus der Elektrophorese-Apparatur für 5 min in *semi-dry*-Puffer gelegt. Daraufhin positioniert man eine Nitrozellulosemembran auf drei mit *semi-dry*-Puffer befeuchtete Whatman-Papiere in Größe des Geles. Auf die Membran kommt nun das Gel und auf dieses wiederum drei Lagen feuchtes Whatman-Papier. Luftblasen werden durch Abrollen entfernt. Der Papier-Gel-Membran-Papier-Stapel wird in eine Semi-Dry-Transfer-Zelle überführt und bei 100 mA/Gel (2mA/cm^2) für 1 h einer elektrischen Spannung ausgesetzt. Es ist darauf zu achten, daß der Stapel so zwischen die flächigen Elektroden positioniert wird, daß die negativ geladenen, SDS-beladenen Proteine auf ihrem Weg zur Anode auf die Membran treffen. Im Idealfall binden die Proteine fest an der Nitrozellulosemembran und können nun mittels spezieller Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

2.6.4 Immunologischer Proteinnachweis

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf die Nitrozellulosemembran übertragen worden sind, lassen sie sich jetzt durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Die Membran wird hierzu ÜN bei 4 °C oder alternativ für 3h bei RT in eine Blockierungslösung (5% Milchpulver [Fa. Rapilait] in TBST) gelegt. In dieser Lösung kann die Nitrozellulose auch bei 4 °C aufbewahrt werden, wenn 0.05 % Natriumacid hinzugefügt wird. Vor Zugabe des ersten Antikörpers wird die Membran für 1 min in TBST geschwenkt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt ebenfalls bei 4 °C ÜN in einem geeigneten Gefäß. Hierzu wird der Erstantikörper in der jeweils optimalen Verdünnung (1:1000 bis 1:10.000 entspricht einer Endkonzentration von 0.1 µg/ml bis 1,0µg/ml) in 5 ml TBST / 1% Milchpulver eingesetzt. Am nächsten Tag wird zweimal für 30 sec und zweimal für 30 min durch Schwenken in TBST gewaschen. Die antikörperhaltige Lösung kann aufgefangen und nach Versetzen mit 0.1 % Natriumacid bei 4 °C gelagert werden. Der zweite Antikörper (gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, Fa. Dako) wird in einer Verdünnung von 1:2.000 in TBST hinzugegeben und für 45 – 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wird zweimal für 30 sec und einmal für 30 min bei RT in TBST geschwenkt. Abschließend wird die Membran für 10 min in TBS gewaschen. Zur Entwicklung wird die Membran in 5 ml eines 1:1 Gemisches aus Entwickler / Verstärker (ECL-Kit, Fa. Amersham) übertragen und für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Membran zwischen zwei Overhead-Folien gelegt und Luftblasen durch Herausrollen entfernt. Hiernach wird ein Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm) für 0.5 bis 2 min aufgelegt, entwickelt und abschließend der Marker auf den Film übertragen.

Soll die selbe Membran für den Nachweis eines weiteren Proteins verwendet werden, können die Antikörper-Komplexe mittels „*stripping*“ entfernt werden. Hierzu wird die Membran für 30 min bei 56 °C in Stripping-Lösung gelegt und anschließend 3 x für 10 min unter Schütteln mit TBST gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgt in TBST / 5 % Milchpulver.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren vorgestellt. Es wird die Frage beantwortet, ob die retroviralen Vektoren die Fähigkeit besitzen, Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu infizieren und die integrierten DNA-Sequenzen zu exprimieren. Zusätzlich wird die Auswirkung der retroviralen Einschleusung und Expression von humanem Angiopoietin-2 in der Retina auf den Perizytenbesatz der Netzhautkapillaren beschrieben.

3.1 Erzeugung von retroviralen Expressionsvektoren

Der erste Schritt in der Überprüfung, ob retrovirale Vektoren für die Schaffung eines Tiermodells zur Simulation eines Stadiums der Diabetischen Retinopathie geeignet sind, ist die Klonierung verschiedener retroviraler Expressionsvektor-Plasmide. Es schließt sich die Transfektion des entsprechenden Virusgenoms in eine Verpackungszelllinie an. Hierauf folgt die Isolation mehrerer virusproduzierender Zellklone. Durch Bestimmung des im Zellüberstand befindlichen Virustiters ist es möglich, diejenigen Klone zu isolieren, welche die größte Virusmenge produzieren.

3.1.1 Klonierung von retroviralen Expressionsvektoren

Unter Verwendung des retroviralen Plasmids „pLXSN“ der Fa. Clontech Laboratories und entsprechender Insertionssequenzen konnten mehrere Expressionsvektoren geschaffen werden (s. **Tab. 7**; s. **2.3, 2.4, 2.5**). Diese enthalten als exogene DNA die Sequenzen von Reportergenen wie der β -Galaktosidase (LacZ) oder der Alkalischen Phosphatase der Plazenta (PLAP). Weiterhin kam ein virales Konstrukt zum Einsatz, das als Expressionskassette die Sequenz von humanem Angiopoietin-2 (Ang-2) trägt.

Tab. 7 Verwendete retrovirale Expressionsvektoren

Expressionsvektor	Plasmid	Exprimiertes Protein
LXSN/LacZ	pLXSN/LacZ	B-Galaktosidase
LXSN/PLAP	pLXSN/PLAP	Alkalische Phosphatase der Plazenta
LXSN/hAng-2	pLXSN/hAng-2	Angiopoietin-2

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung sind neben analytischen Restriktionsverdaus auch Teilsequenzierungen des fertigen Konstrukts vorgenommen worden (nicht gezeigt).

Diese Analysen konnten eindeutig beweisen, dass die retroviralen Vektoren die gewünschten Elemente in richtiger Orientierung tragen.

Die verschiedenen inkompletten retroviralen Konstrukte (s. **Abb. 19**) wurden anschließend mittels Calciumphosphat-Transfektion in eine Verpackungszelllinie überführt. In diesen Zellen erfolgte die endgültige Synthese von replikationsinkompetenten aber infektiösen Viren, die in ihrem Genom die einklonierte DNA-Sequenz tragen.

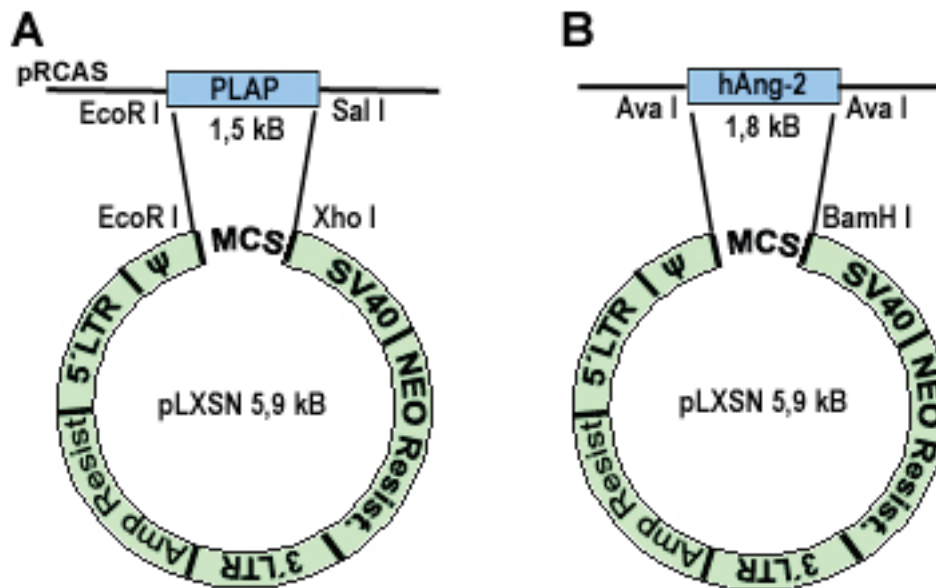


Abb. 19 Genetischer Hintergrund pLXSN/PLAP und pLXSN/hAng-2

Schematische Darstellung der Strukturelemente des rekombinanten Vektorplasmids pLXSN/PLAP zur Expression des Reprterenzym "alkalische Phosphatase der Plazenta" (A) und des Vektorplasmids pLXSN/hAng-2 zur Expression von humanem Angiopoietin-2 (B). Gezeigt sind die Anteile des Vektors pLXSN (grün) und der einklonierten heterologen DNA-Sequenz (blau). Die Restriktionsendonukleasen-Schnittsequenzen sind als Buchstaben-Zahlen-Kombination wiedergegeben (s.a. 2.3.1. und 7.3)

3.1.2 Isolierung von Verpackungzell-Klonen mit hoher Virusproduktion.

Den retroviralen Konstrukten fehlen zur Replikation bestimmte Proteine, die allerdings von einer bestimmten Verpackungszelllinie synthetisiert werden. Für die Produktion eines infektiösen Viruspartikels muß das „Genom“ der Expressionsvektoren daher in diese GP+E86-Verpackungszellen durch Transfektion eingeschleust werden. Da die Konstrukte zusätzlich zu den Expressionskassetten ein G418-Resistenzgen (Neomycin-Resistenz) tragen, konnten durch Neomycin-Selektion die erfolgreich transfizierten Zellen isoliert werden. Pro Konstrukt wurden anschließend mindesten 5 Klone vereinzelt und deren Virus-Produktionsrate mit Hilfe eines Titertests (s. 2.4.7) ermittelt (s. **Tab. 8**).

Tab. 8 Virustiter verschiedener virusproduzierender Verpackungszellklone

Expressionsvektor	CFU/ml im ÜS von Klon _{max}	CFU/ml im ÜS von Klon _{max} konzentriert
LXSN	$8,8 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$
LXSN/LacZ	$1,3 \times 10^5$	---
LXSN/PLAP	$1,0 \times 10^6$	$4,7 \times 10^7$
LXSN/hAng-2	$7,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^7$

CFU = *colony forming units* (Viruspartikel); ÜS = Überstand; Klon_{max} = Verpackungszellklon mit maximaler Virusproduktion

3.2 Infektiösitätsnachweis der verwendeten retroviralen Konstrukte.

Um die Infektiösität der produzierten Viren zu testen, können *in vitro*-Infektionen von Zellkulturen mit Reporter-gen-Expressionsvektoren vorgenommen oder die Netzhäute der Versuchstiere *in vivo* infiziert werden. Je nach Expressionsmuster des Reportergens in der Zellkultur oder in den infizierten Netzhäuten sind Aussagen über die Qualität und den Umfang der Infektion möglich.

3.2.1 PLAP-Färbung von Fibroblasten nach Infektion mit LXSN/PLAP *in vitro*.

Die durchgeführten Titertests (s.o.) zeigten die höchste Virusproduktionsrate in einem Verpackungszellklon, der Alkalische-Phosphatase-Expressionsvektoren (LXSN/PLAP) synthetisiert (s. **Tab. 8**). Da durch einen hohen Virustiter die Infektion des Wirtsgewebes am wahrscheinlichsten ist, wurde deshalb die Plazentale Alkalische Phosphatase (PLAP) für den Infektiösitätsnachweis als Reporter gewählt. Hierzu wurden 3T3-Fibroblasten mit durch Zentrifugation aufkonzentriertem Überstand (s. **2.4.8**) des LXSN/PLAP-produzierenden Klons beimpft und nach einigen Tagen eine Alkalische-Phosphatase-Färbung durchgeführt. Durch den Nachweis gefärbter Fibroblastenklone konnte eindeutig gezeigt werden, dass der retrovirale Expressionsvektor LXSN/PLAP *in vitro* zur Infektion von 3T3-Fibroblasten fähig ist und die einklonierte Gensequenz exprimiert (s. **Abb. 20**).

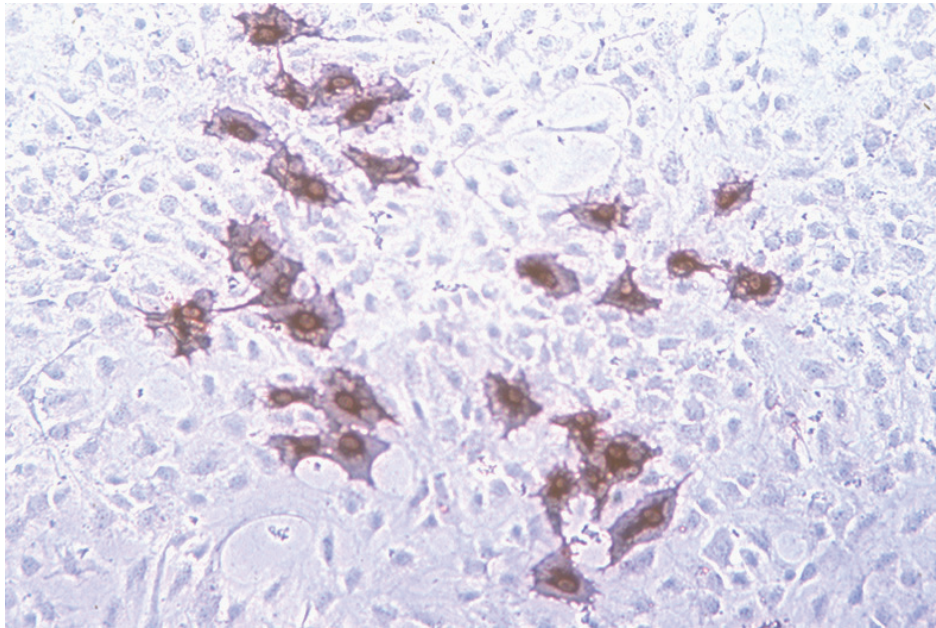


Abb. 20 Expressionsmuster der alkalischen Phosphatase nach Infektion von 3T3-Fibroblasten mit dem Vektor LXSN/PLAP.

Deutlich sind die PLAP-positiven Zellen eines Klons im Zellrasen zu erkennen. Die Zahl und Anordnung der gefärbten Fibroblasten lassen auf bereits mehrfach erfolgte Teilung der ursprünglich infizierten Zelle schließen.

3.2.2 PLAP-Färbung der Netzhaut nach Infektion mit LXSN/PLAP *in vivo*.

Die *in vitro*-Infektiösität des retroviralen Expressionsvektors LXSN/PLAP konnte, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, zweifelsfrei nachgewiesen werden. Ob diese Eigenschaft auch für die Infektion eines Organismus gilt, soll nun gezeigt werden. Hierzu sind wiederum Zellüberstände des LXSN/PLAP-produzierenden Verpackungszellklons entnommen und aufkonzentriert worden. Es folgte die intravitreale Injektion der Retroviren (LXSN/PLAP) in 5 Wochen alte Wistar-Ratten, als Kontrolle diente die Injektion des „leeren“ Vektors (LXSN). Nach unterschiedlichen Zeiten wurden die Netzhäute freipräpariert und eine Alkalische-Phosphatase-Färbung vollzogen. Es zeigten sich eindeutig Alkalische-Phosphatase-exprimierende Zellen (s. Abb. 21). Da in der Netzhaut die Expressionsrate von endogener alkalischen Phosphatase sehr gering ist und eventuell vorhandenes endogenes Enzym durch Hitze-Inaktivierung ausgeschaltet wurde, handelt es sich bei den gefärbten Zellen eindeutig um LXSN/PLAP-infizierte Netzhautzellen. Somit ist auch die *in vivo*-Infektiösität der LXSN/PLAP-Retroviren bewiesen.

Die infizierten Ratten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 7, 10 Tage) getötet, um unterschiedliche Inkubations- und Expressionszeiten zu gewährleisten. Von den fünf Versuchstieren zeigte nur die Retina einer Ratte nach siebentägiger Inkubation Alkalische-

Phosphatase-Färbung. Das Infektionsgebiet (PLAP-positive Zellen) repräsentierte etwa 1/35 der gesamten Netzhautfläche.

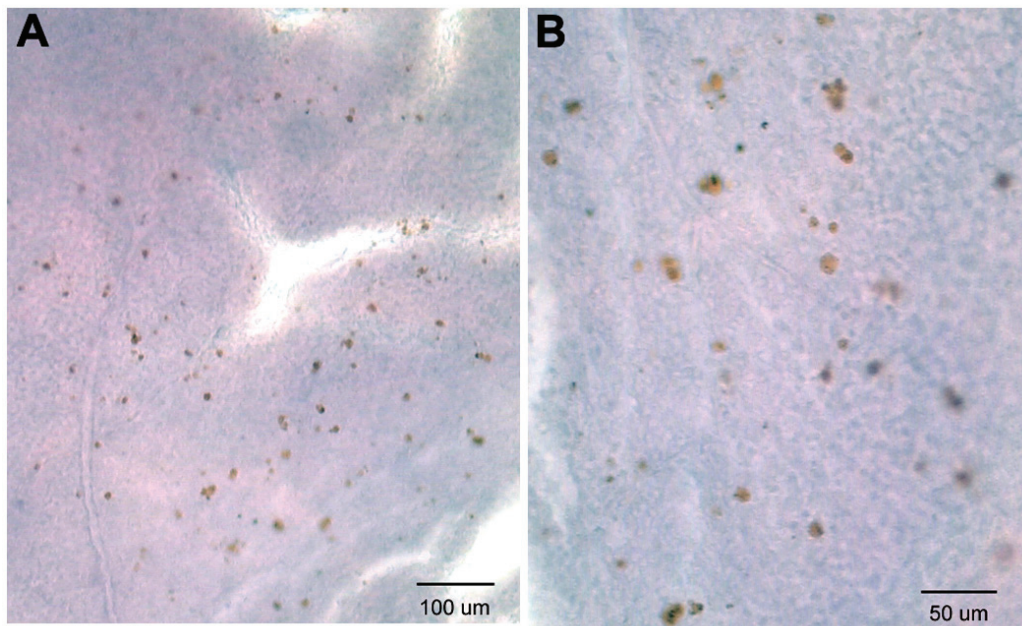


Abb. 21 Alkalische Phosphatase-Färbung einer mit LXS/PLAP-infizierten Netzhaut

Die Abbildungen zeigen ein rundlich-ovales Infektionsgebiet, in dem multiple PLAP-positive Zellen liegen. Der infizierte Bereich entspricht etwa 1/35 der gesamten Netzhautfläche. Der in A zentral gelegene helle Bereich ist ein Präparationsartefakt.

3.3 Einschleusung von Angiopoietin-2 in Wirtszellen mit Hilfe retroviraler Expressionsvektoren.

In der Pathogenese der Diabetischen Retinopathie kommt es sehr früh zum Perizytenabfall von den Kapillaren der Netzhaut. Es ist bekannt, dass dieser Effekt durch Angiopoietin-2 induziert werden kann (Hammes et al. 2004). Durch retrovirale Einschleusung von Angiopoietin-2 in die Netzhaut soll dieser Effekt nachvollzogen und somit die diabetische Situation imitiert werden. Würde dies gelingen, könnte man versuchen, den Perizytenabfall durch Applikation eines Angiopoietin-2-Antagonisten (Angiopoietin-1) zu verhindern.

Es wurden LXS/hAng-2-Expressionsvektoren in zwei verschiedene Tiermodelle injiziert und der Perizytenbesatz der Netzhautkapillaren bestimmt. Zuvor sollte jedoch die Infektiosität des Expressionsvektors LXS/hAng-2 und seine Fähigkeit zur Expression von Angiopoietin-2 getestet werden. Dies geschah mit Hilfe eines Immunoblots (Western-Blot, s. 3.3.1).

3.3.1 Western-Blot zum Nachweis der Expression von Angiopoietin-2 in LXS/hAng-2-virustransformierten Fibroblasten.

Zum Nachweis der Expression von humanem Angiopoietin-2 in LXS/hAng-2-Retrovirus-infizierten 3T3-Fibroblasten wurde ein Immunoblot (Western-Blot) durchgeführt. Mit Hilfe

eines humanspezifischen Antikörpers (R&D 623) war es möglich, virales Angiopoietin-2 im Überstand der Fibroblasten nachzuweisen (s. **Abb. 22**). Somit konnte gezeigt werden, dass der retrovirale Vektor LXS_N/hAng-2 infektiös ist und in den Wirtszellen Angiopoietin-2 exprimiert, das erwartungsgemäß in den Zellüberstand sezerniert wird.

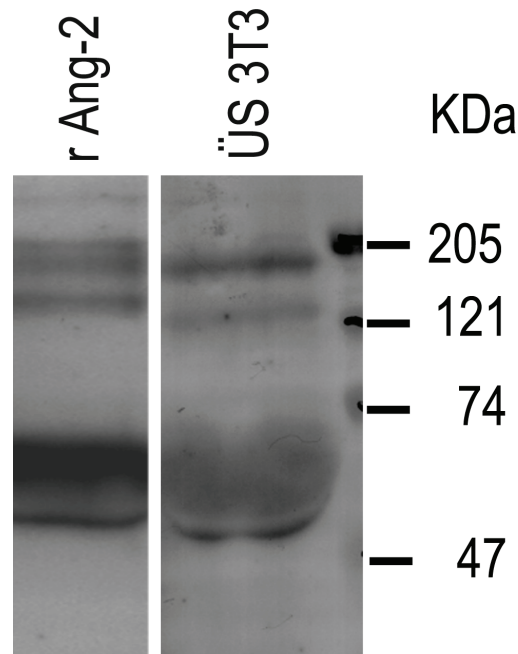


Abb. 22 Western-Blot zum Nachweis der Expression von Angiopoietin-2 in Fibroblasten, die mit LXS_N/hAng-2-Retrovirus infiziert wurden.

Die Probe aus dem Überstand einer infizierten Fibroblastenkultur zeigt das identische Bandenmuster wie das rekombinante humane Angiopoietin-2. Die Angiopoietin-2 Banden finden sich erwartungsgemäß im Bereich des Angiopoietin-2 Molekulargewichts. Die im Bereich hohen Molekulargewichts liegenden Banden repräsentieren Angiopoietin-2 Multimere.

Neben der Infektion von 3T3-Fibroblasten erfolgte auch eine intravitreale Injektion des Expressionsvektors LXS_N/hAng-2 in Ratten. Anschließend wurden die Netzhäute lysiert und eine Proteinextraktion vorgenommen. Im Western-Blot konnte jedoch kein humanes Angiopoietin-2 nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.3.2 Enzymatische Netzhautdigestion nach Injektion von LXS_N/hAng-2 in die Ratte.

Nachdem die Expression von humanem Angiopoietin-2 in Wirtszellen (Fibroblasten) nachweisbar war und somit die Funktionalität der geklonten Vektoren bewiesen wurde, sollten die Retroviren nun verwendet werden, um Angiopoietin-2 in der Netzhaut der Versuchstiere stetig zu exprimieren und dadurch eine frühe Phase der Diabetischen Retinopathie in Form von Perizytenverlust zu simulieren. Nach intravitrealer Injektion der retrovirealen Vektoren in fünf Wochen alte männliche Ratten wurden die Netzhäute nach

sieben Tagen präpariert. Zur Auszählung des Perizytenbesatzes wurden Netzhautdigestionen durchgeführt (s. **Abb. 23**) und die Perizyten nach PAS-Färbung aufgrund ihrer Morphologie mit Hilfe eines Computerprogramms ausgezählt.

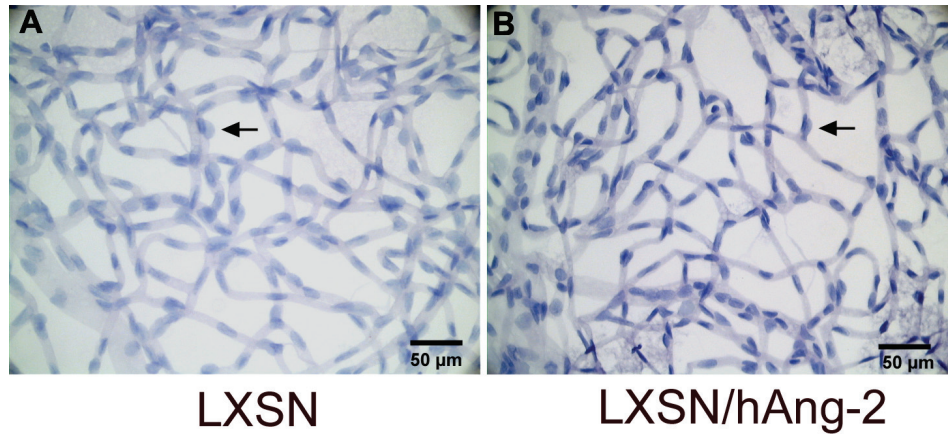


Abb. 23 Enzymatische Netzhautdigestionen nach Injektion von LXSN/hAng-2.

Abbildung **B** zeigt das isolierte Kapillarsystem der Netzhaut einer mit dem retroviralen Vektor LXSN/hAng-2 infizierten Ratte. Deutlich sind die in der PAS-Färbung blau erscheinenden Perizyten zu erkennen (**Pfeil**), die auf den Kapillaren sitzen. Im Vergleich zur Digestion der Netzhaut eines mit dem Leervektor (LXSN) infizierten Tieres (**A**) ist makroskopisch kein Unterschied in der Gefäßmorphologie festzustellen.

Die Analysen der verschiedenen Versuchsgruppen zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen Tieren nach LXSN/hAng-2 Injektion und Applikation des „leeren“ Vektors (LXSN). Das Gefäßsystem zeigt keine morphologischen Auffälligkeiten (s. **Abb. 23**).

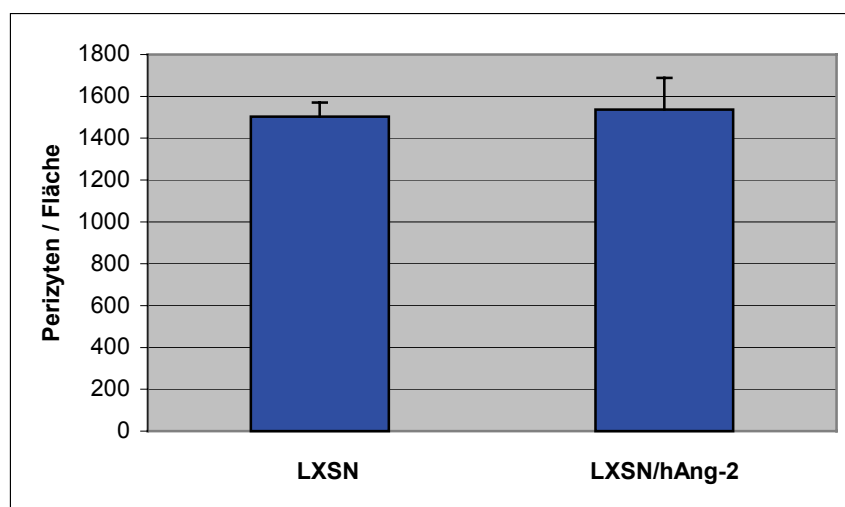


Abb. 24 Perizytenbesatz der Netzhautkapillaren nach Injektion viraler Vektoren

In den mit LXSN/hAng-2 infizierten Augen ist keine signifikante Änderung des Perizytenbesatzes im Vergleich zu der Kontrollinjektion festzustellen. Allerdings ist die Standardabweichung des Perizytenbesatzes nach LXSN/hAng-2-Injektion deutlich höher als in der Kontrolle. $P > 0.05$ $n = 5$

Azelluläre Kapillaren (Gefäßdegeneration) sind in beiden Gruppen nachweisbar und somit nicht spezifisch. Die statistische Auswertung des Perizytenbesatzes zeigt keinen Unterschied zwischen Netzhäuten nach LXS_N/hAng-2- und LXS_N-Applikation (s. **Abb. 24**).

3.3.3 LacZ-Färbung der Retina nach Injektion von LXS_N/hAng-2 in PlacZ-Mäuse.

Um die Auszählung des Perizytenbesatzes zu erleichtern und nicht auf morphologische Kriterien bei der Identifizierung der Perizyten angewiesen zu sein, wurden die retroviralen Vektoren zusätzlich in eine transgene Mauslinie injiziert, die als Insertionsmutante β -Galaktosidase in ihren Perizyten exprimiert (s. 2.2.6).

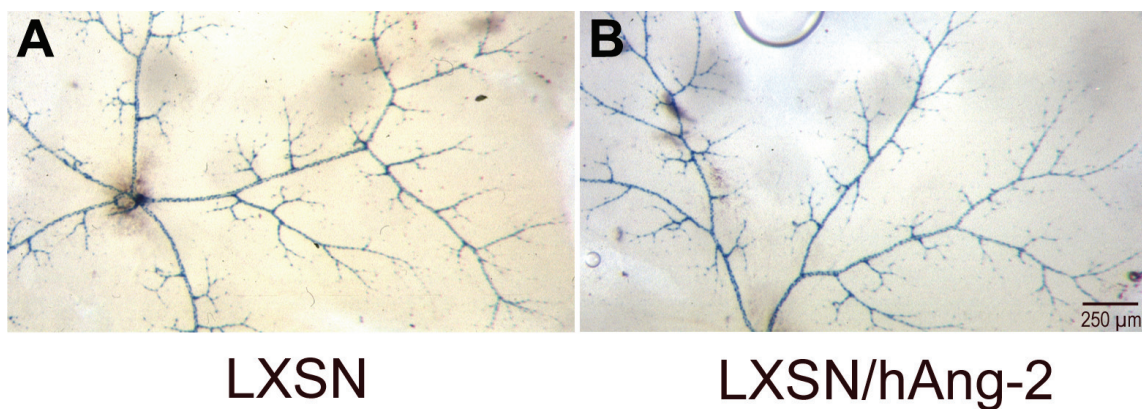


Abb. 25 LacZ-Färbung der Netzhaut von PlacZ-Mäusen nach Infektion mit LXS_N/hAng-2 bzw. LXS_N.

Deutlich ist die Expression der β -Galaktosidase in den Perizyten der Netzhaut zu erkennen. Dadurch sind der Verlauf der Gefäße und die Aufzweigungen bis in die Kapillaren gut auszumachen. Makroskopisch lassen sich keine Unterschiede in den Gefäßstrukturen nach Injektion der Viren nachweisen. Beachte den Austritt der *Arteria centralis retinae* aus den *Nervus opticus* (A).

Somit konnte der Perizytenbesatz nach LacZ-Färbung durch einfaches Auszählen statistisch erfasst werden. Es zeigten sich jedoch nach LacZ-Färbung der gesamten Netzhaut keine morphologische Besonderheiten im Gefäßphänotyp (s. **Abb. 25**).

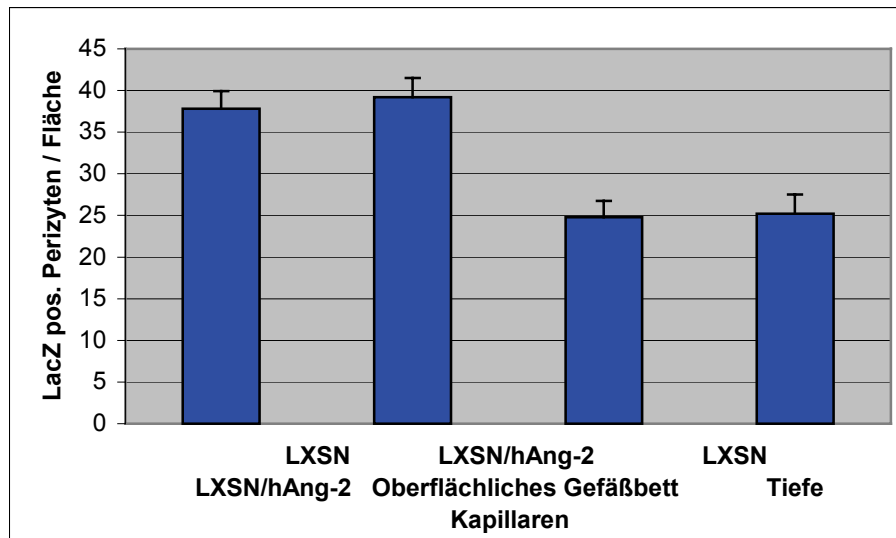


Abb. 26 Graphische Darstellung des Perizytenbesatzes in PlacZ-Mäusen nach intravitrealer Injektion von LXSN/hAng-2 bzw. LXSN.

Analysiert wurden die Perizytenkonzentrationen der oberflächlichen und der tiefen Kapillarbetten. In beiden Fällen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Perizytenbesatz nach Injektion der Vektoren LXSN/hAng-2 und LXSN (Leervektor). Allerdings ist die absolute Perizytenkonzentration auf den größeren Gefäßen der oberflächlichen Gefäßschicht deutlich höher als die der tiefen Kapillarbetten. $p > 0.05$; $n = 5$.

Auch die quantitative Auswertung (s. **Abb. 26**) erbrachte keinen Unterschied in der Perizytenkonzentration beider Versuchsgruppen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Beobachtungen aus den Digestions-Experimenten.

4. Diskussion

4.1 Synthese und Charakterisierung rekombinanter retroviraler Vektor-Plasmide

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Angiopoietin-2 zu einer Verminderung der Perizytenzahl auf den Kapillaren der Netzhaut führt [Hammes et al. 2004]. Dieser Perizytenabfall wird ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt der Diabetischen Retinopathie beobachtet und ist Voraussetzung für die Ausbildung weiterer Gefäßanomalien, die letztlich zur Erblindung des Patienten führen. In diabetischen Mäusen, deren Inselzellen medikamentös zerstört wurden, kann eine Aktivierung des Angiopoietin-2 Promoters in der Netzhaut nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der im Frühstadium der Diabetischen Retinopathie beobachtete Perizytenabfall durch Angiopoietin-2 vermittelt wird. Durch Antagonisierung dieses Angiopoietin-2 Effekts wäre eine Therapie der Diabetischen Retinopathie zu einem frühen Zeitpunkt möglich. Als Antagonisten kommen neben Angiopoietin-1 [Joussen et al. 2002] und löslichem Tie-2 Rezeptor (beide kompetitive Angiopoietin-2 Hemmung) auch Angiopoietin-2 bindende RNA (Aptamere) [White et al. 2003] oder anti-Angiopoietin-2 Antikörper [Cai et al. 2003] in Frage (irreversible Hemmung). Zur Identifizierung des für eine Inhibition des Angiopoietin-2 vermittelten Perizytenabfalls am besten geeigneten Pharmakons ist ein *in vivo* Modell wünschenswert, das exakt das Stadium der Diabetischen Retinopathie zeigt, in der aufgrund eines hohen Angiopoietin-2 Spiegels Perizytenabfall stattfindet. Das für die Genese dieser Situation erforderliche Überangebot an Angiopoietin-2 in der Netzhaut kann auf verschiedene Weise erreicht werden. Für unsere Fragestellung am geeignetsten erscheint die Verwendung von retroviralen Vektoren zur Einschleusung von exogener Angiopoietin-2-DNA in das Auge der Versuchstiere. Der Einsatz von Retroviren hat im Vergleich zu direkter Proteininjektion mehrere Vorteile, auf die später noch genauer eingegangen wird. Sasaki et al. konnte mit Hilfe von retroviralen Vektoren, die *antisense*-VEGF exprimieren, *in vivo* Tumorangiogenese von Gliomen unterbinden und die Lebenszeit von Versuchstieren signifikant verlängern [Sasaki et al. 1999]. Weiterhin war es möglich, durch den Einsatz von Retroviren einen Inhibitor der Matrix Metalloproteinase-3 (TIMP-3) in Tumorgewebe einzuschleusen und durch eine resultierende Verminderung der Angiogenese das Wachstum von Neuroblastomen *in vivo* zu unterdrücken [Spurbeck et al. 2003]. Diese erfolgreichen retroviralen Therapieansätze in der Tumorbildung lassen darauf schließen, dass eine retrovirale Therapie im Auge ebenfalls möglich ist. Mit Hilfe der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Methoden konnten wir mehrere für unsere Fragestellung geeignete retrovirale Konstrukte

synthetisieren. Neben dem rekombinanten Virusplasmid pLXSN/hAng-2, das die Sequenz des humanem Angiopoietin-2 trägt, wurden auch zwei weitere Vektorplasmide kloniert, die jeweils ein Reportergen tragen (pLXSN/PLAP und pLXSN/LacZ). Durch analytischen Restriktionsverdau und zusätzlicher Sequenzierung der Plasmid-DNA konnte eindeutig die korrekte Integration der heterologen Genesequenzen in das Ursprungsplasmid pLXSN bewiesen werden. Das retrovirale Vektorplasmid pLXSN [Coffin et al. 1996, Miller et al. 1986] leitet sich vom *Moloney murine leukemia virus* und vom *Moloney murine sarcoma virus* ab (s. 2.3.1). Nach Amplifikation der retroviralen Konstrukte durch Bakterien standen ausreichende Mengen entsprechender Vektorplasmid-DNA zur Verfügung, um mit Hilfe von Verpackungszelllinien infektiöse Viruspartikel zu synthetisieren.

4.2 Erzeugung und Isolierung virusproduzierender Verpackungszellklone

Die klonierten Vektorsplasmide wurden zur Produktion infektiöser Viruspartikel in Verpackungszellen (GP+E86 Zellen) transfiziert, die hierdurch eine G418-Resistenz (Neomycin-Analogon) erhalten haben. Erfolgreich transfizierte GP+E86 Zellen konnten somit in Neomycin-haltigem Medium selektioniert werden. Dazu wurden die Zellen hochverdünnt ausplattiert und die sich nach einigen Tagen zeigenden resistenten Klone isoliert. Pro Konstrukt wurden mindestens 5 Klone propagiert und durch einen Titertest deren Potential zur Virusproduktion bestimmt (s. 2.4.7). Die von uns verwendete Kombination aus gentechnisch verändertem LXSN-Retrovirusgenom und der Verpackungszelllinie GP+E86 repräsentiert die dritte Generation retroviraler Vektorsysteme. Dieses Vektorsystem der Fa. Clontech vereinigt mehrere Sicherheitsvorkehrungen (s. 1.5.2) und reduziert stark die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Rekombinationsereignisse, was replikationskompetente Viren zur Folge hätte. So liegen die für die Synthese infektiöser Retroviren benötigten Gensequenzen auf drei unterschiedlichen Genloci bzw. Plasmiden. Da die beschriebene Verpackungszelllinie GP+E86 bereits in anderen Experimenten erfolgreich zur Expression heterologer Gensequenzen eingesetzt wurde [Sasaki et al. 1999], kann auch in unseren Experimenten von einer erfolgreichen Virusproduktion ausgegangen werden. Aus den angeführten Gründen wählten wir für unsere Experimente das oben genannte retrovirale Vektorsystem.

Die durchgeführten Titertests ergaben maximale Viruskonzentrationen im Zellüberstand nach Ausschlussfiltration von etwa 10^7 CFU/ml. Eine höhere Konzentration ist für Retroviren nicht zu erwarten, hingegen lassen sich durch die Verwendung von anderen Virengruppen wie z.B. Adenoviren Konzentrationen von bis zu 10^{13} CFU/ml erreichen [Bennett et al. 1994]. Die

höchste Konzentration an reportergetragenden Retroviren zeigte ein Klon der pLXSN/PLAP-transfizierten Verpackungszellen. Daher erhielt dieser Reporter in den geplanten Experimenten den Vorzug vor dem β -Galaktosidase tragenden Vektor LXSN/LacZ. Ein weitere Vorteil der Verwendung des Reporterproteins PLAP ist deren Hitzestabilität. Endogene Alkalische Phosphatase lässt sich durch Hitzebehandlung inaktivieren. Dies ist im Fall der Galaktosidase-Isoenzyme nicht möglich. Auf diese Weise kann eventuell störende Hintergrundfärbung durch die endogene alkalische Phosphatase im Wirtsgewebe vermieden werden.

4.3 Nachweis der Infektiösität rekombinanter Retroviren und erfolgreicher Transgenexpression *in vitro* und *in vivo*

Die Isolierten Verpackungszellklone mit maximaler Virusproduktion wurden zur Gewinnung von Zellüberständen genutzt. Mit Hilfe von Ausschlussfiltration konnte die Viruskonzentration für den Vektor LXSN/PLAP auf $4,7 \times 10^7$ CFU/ml und für LXSN/hAng-2 auf $2,8 \times 10^7$ CFU/ml erhöht werden. Zum Nachweis der *in vitro*-Infektiösität der produzierten Retroviren wurden 3T3-Fibroblasten mit konzentriertem, LXSN/PLAP-haltigem Zellüberstand infiziert. Nach Inkubation der Fibroblasten zeigten sich Zellhaufen, die alkalische Phosphatase positiv waren. Somit war bewiesen, dass die von uns verwendeten Konstrukte Wirtszellen infizieren und die einklonierte heterologe DNA *in vitro* exprimieren können. Da die Bedingungen der Zellkultur nicht mit denen vergleichbar sind, die in einem lebenden Organismus herrschen, war der nächste Schritt die Überprüfung der Infektiösität *in vivo*. Hierzu wurden die retroviralen Vektoren inklusive der Reportersequenz mit Hilfe einer Hamilton-Spritze intravitreal injiziert. Nach einwöchiger Inkubation und anschließender Präparation der Netzhaut zeigte sich ein rundlich-ovaler Bereich, in dem einzelne Zellen Alkalische Phosphatase positiv waren und der in etwa 1/35 der gesamten Netzhautfläche entsprach. Um sicher zu gehen, dass es sich dabei um die viral exprimierte hitzestabile Alkalische Phosphatase der Plazenta handelt, wurde die endogene Alkalische Phosphatase durch Erhitzen der Netzhaut vor der Färbung zerstört. In einer anderen Studie konnte die Expression eines retroviral transferierten Reportergens ebenfalls nur in den Zellen eines rundlichen Gebietes direkt um die Einstichstelle des Applikationsinstruments herum beobachtet werden [Chowers et al. 2001]. Bei einem Injektionsvolumen von 10 μ l entspricht die absolute Anzahl injizierter LXSN/PLAP-Viren ca. $4,7 \times 10^5$. Das beobachtete punktuelle Verteilungsmuster infizierter Zellen gleicht demjenigen, das Bennett et al. für eine Viruszahl von ebenfalls 10^5 beschriebenen hat [Bennett et al. 1994].

Wie beschrieben, ist es mit Hilfe der von uns verwendeten Methode der intravitrealen Injektion retroviraler Vektoren möglich, Zellen der Netzhaut zu infizieren und die gewünschten Proteine in diesen zu exprimieren. Zur Überprüfung der Funktionalität des Vektors LXS_N/hAng-2 wurden daraufhin 3T3-Fibroblasten *in vitro* mit den Überständen des entsprechenden Verpackungszellklons beimpft und die erfolgreiche Infektion der Fibroblasten und nachfolgende Expression des exogenen Angiopoietin-2 durch einen Westernblot überprüft. Mit Hilfe eines humanspezifischen Antikörpers war Angiopoietin-2 im Überstand der 3T3-Fibroblasten nachweisbar. Das leicht versetzte Bandenmuster zwischen der Probe und dem rekombinanten Angiopoietin-2 ist evtl. auf die geringeren Mengen Protein in den Zellüberständen zurückzuführen, die deswegen das Polyacrylamidgel schneller durchwandern. Es ist auch denkbar, dass das rekombinante Angiopoietin-2 im Vergleich zum viralen Protein unterschiedlichen Glykosylierungsstatus besitzt und die minimalen Laufunterschiede daher rühren. Die relativen Abstände der einzelnen Banden stimmen jedoch mit denen der Positivkontrolle überein. Die im Bereich höheren Molekulargewichts liegenden Banden repräsentieren nicht dissoziierte Angiopoietin-2-Multimere [Procopio et al. 1999]. Somit war auch für dieses Vektorkonstrukt bewiesen, dass es zur Infektion des Wirtsgewebes fähig ist und in selbigem die eingeschleuste heterologe DNA-Sequenz exprimiert. Da das humane Angiopoietin-2 im Überstand der 3T3-Fibroblasten nachweisbar war, kann gefolgert werden, dass das Protein von den Zellen in den Überstand sezerniert wird. In Lysaten der Fibroblasten konnte kein Angiopoietin-2 nachgewiesen werden. Dies kann auf die Art der Präparation oder auf die baldige Sezernierung des Proteins in den Zellüberstand zurückgeführt werden. *In vivo* war nach intravitrealer Injektion von LXS_N/hAng-2 ebenfalls kein Angiopoietin-2 Nachweis in Lysaten der Netzhaut möglich. Dies könnte ebenfalls auf die Art der Lysate-Herstellung zurückzuführen sein. Es ist jedoch außerdem denkbar, dass aufgrund der relativ großen Zellmasse einer Netzhaut und den verhältnismäßig wenigen infizierten Zellen eine zu hohe Verdünnung des Angiopoietin-2 stattfand und es daher nicht nachweisbar war (s.u.). Die Infektiösität der retroviralen LXS_N/hAng-2 Vektoren konnte mit den geschilderten Experimenten jedoch zweifelsfrei bewiesen werden. Ebenso war die Expression der inklonierten heterologen (xenogenen) Angiopoietin-2 Sequenz in Fibroblasten eindeutig nachweisbar. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit der Vektoren wäre die quantitative Biosynthese von bestimmten Proteinen durch Infektion einer „Produktionszelllinie“ mit den Retroviren. Dieses Vorgehen würde eine chemische Transfektion der Zellen ersetzen und zu steter Proteinexpression führen.

4.4 Eignung retroviraler Vektoren zur Simulation eines frühen Stadiums der Diabetischen Retinopathie

Zur isolierten Simulation des Frühstadiums der Diabetischen Retinopathie (Angiopoietin-2 vermittelter Perizytenabfall von den Kapillaren der Retina) ist es notwendig, im Bereich der Netzhaut eine erhöhte Angiopoietin-2 Konzentration zu schaffen. Dies ist auf verschiedene Weise möglich. So kann Angiopoietin-2 als Protein direkt in den *Bulbus oculi* injiziert oder die Angiopoietin-2 codierende cDNA in das Genom des Versuchstieres eingeschleust werden. Dies kann zum einen durch retroviralen Transfer in das adulte Tier erfolgen, oder man erzeugt durch Mikroinjektion der Angiopoietin-2 DNA-Sequenz in einen Pronukleus der Zygote transgene Tiere. Im Gegensatz zu der intravitrealen Injektion von Angiopoietin 2-Protein hat die Injektion von Angiopoietin-2 kodierenden, retroviralen Vektoren einige Vorteile. So ist nach Infektion der Netzhaut mit den Viren eine stete Angiopoietin-2 Expression zu erwarten. Bei der Proteininjektion ist der Wirkungszeitraum des Angiopoietins von seiner Halbwertszeit abhängig. Diese wird wiederum von der Stabilität des Moleküls und der Immunreaktion des Wirtsorganismus bestimmt. Für einen dauerhaften therapeutischen Effekt wären daher mehrere Injektionen nötig, was mit einer unverhältnismäßig hohen Verletzung des Bulbus einhergehen würde. Transgene Tiere, die in der Netzhaut Angiopoietin-2 exprimieren, haben ebenfalls den Vorteil der steten Bildung des Proteins. Allerdings beginnt in diesem Tiermodell die Angiopoietin-2 Überexpression zu Zeiten der embryonalen Phase je nach verwendetem Promoter sehr früh. Daher kann mit diesem Modell nicht ausgeschlossen werden, dass das Initialstadium der Diabetischen Retinopathie in Form von Perizytenabfall überschritten ist und bereits stärkere Gefäßmißbildungen wie z.B. azelluläre Kapillaren auftreten [Engerman et al. 1984]. Die frühe Angiopoietin-2 Wirkung wäre somit nicht mehr antagonisierbar und damit wäre dieses Modell zur Identifizierung therapeutisch nutzbarer Antagonisten nicht mehr geeignet. Gleiches gilt für die indirekte Erhöhung des endogenen Angiopoietin-2 Spiegels in künstlich (medikamentös) erzeugten diabetischen Tieren. Eine exakte zeitliche Erfassung des Angiopoietin-2 induzierten Perizytenabfalls ist in diesen Modellen nicht gegeben. Gerade dies ist jedoch durch intravitreale Injektion von retroviralen Vektoren in Tiere beliebigen Alters theoretisch möglich, da der Beginn der Angiopoietin-2 Expression eindeutig bestimmbar ist. In diese Tiere könnten Angiopoietin-2 Antagonisten zu therapeutischen Studien zeitnah appliziert und ihre Wirkung analysiert werden. Das retrovirale Modell kommt auch der pathophysiologischen Genese des Typ 2 Diabetes am nächsten, bei der es im adulten Tier zu einer erworbenen „*de novo*“ Hochregulation von Angiopoietin-2 kommt. Aus den genannten Gründen haben wir uns für die Verwendung von

retroviralen Vektoren zur Erzeugung eines Tiermodells entschieden, das den im Frühstadium der Diabetischen Retinopathie beobachteten Perizytenabfall simulieren soll.

Die von uns verwendeten retroviralen Vektoren haben erwiesener Maßen das Potential, Nagetierzellen zu infizieren und die einklonierten heterologen Gensequenzen in den Wirtszellen zu exprimieren. Weiterhin war es uns möglich, durch intravitreale Injektion Zellen der Netzhaut mit den rekombinanten Viren zu infizieren. Das Gelingen dieser Vorversuche war Bedingung für die Injektion des rekombinanten Retrovirus LXS_N/hAng-2 in 5 Wochen alte Ratten und in transgene PlacZ-Mäuse, um den Angiopoietin-2 vermittelten Perizytenabfall zu induzieren. Das PlacZ-Mausmodell ist eine LacZ-Insertionsmutante und zeigt β -Galaktosidase Expression u. a. in den Perizyten der Netzhaut. Der Vorteil des PLacZ-Modells liegt in der einfachen Erfassung des Perizytenbesatzes der Netzhautgefäße. Durch β -Galaktosidase Färbung der gesamten Netzhaut sind die Perizyten als blaue Punkte im dreidimensionalen Raum leicht auszuzählen. So lässt sich mit diesem Modell zwischen Perizyten des oberflächlichen und tiefen Kapillarbettes unterscheiden.

Die Netzhäute der verwendeten Ratten wurden einer enzymatischen Digestion unterzogen, um die Kapillaren isoliert darstellen und die auf ihnen sitzenden Perizyten mittels PAS-Färbung identifizieren zu können. Als Kontrolle wurde der „Leervektor“ LXS_N ($3,3 \times 10^7$ CFU/ml) injiziert. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Tiermodellen, in denen die Perizyten auf unterschiedliche Weise dargestellt werden können, sollten eventuelle Probleme bei der Identifizierung der Perizyten ausgeschlossen werden.

Sowohl die Auswertungen der Digestionen als auch der β -Galaktosidase Färbung ergab jedoch keinen Unterschied bezüglich der Perizytenkonzentration zwischen den Versuchsgruppen LXS_N/hAng-2 und LXS_N. Dies kann mehrere Ursachen haben. So könnte die Zeit (7 Tage) zwischen Infektion und Analyse der Netzhäute zu kurz gewesen sein, so dass die virale Protein-Biosynthese diejenige der Netzhautzellen noch nicht vollständig unterdrückt hat und der Angiopoietin-2 vermittelte Perizytenabfall daher erst später nachweisbar wird. In anderen Studien [Hammes et al. 2004] reichte eine Woche aus, um nach direkter Angiopoietin-2 Protein-Injektion Perizytenabfall festzustellen. Jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass die in diesen Studien eingesetzten Proteinmengen deutlich über den retroviral synthetisierten liegen. Eine zu geringe Angiopoietin-2 Konzentration als Ursache des ausbleibenden Perizytenverlustes wäre auch durch das verwendete Virussystem selbst erklärbar. So ist bekannt, dass Retroviren bis maximal 10^7 CFU/ml konzentrierbar sind, Adenoviren hingegen bis zu 10^{13} CFU/ml. Die geringere Viruskonzentration hat eine dementsprechend geringere Infektionsrate und Proteinproduktion zur Folge. So waren in

einigen Studien Retroviren bei der Einschleusung eines heterologen Proteins in die Netzhaut gegenüber Adenoviren unterlegen [Chowers et al. 2001]. In weiteren Studien fand sich außerdem eine deutliche Expression viral transferierter Proteine erst ab einer Viruskonzentration von mehr als 10^7 CFU/ml [Bennett et al. 1994]. Die bei der Applikation des LXS/PLAP-Virus erreichte Viruskonzentration von $4,7 \times 10^7$ CFU/ml gleicht der Viruslast, die bei der Injektion von LXS/hAng-2 erreicht wurde ($2,8 \times 10^7$ CFU/ml). Da eine Konzentration von $4,7 \times 10^7$ CFU/ml jedoch nur 1/35 der gesamten Netzhautfläche infiziert (s. 3.2.2), ist verständlich, dass $2,8 \times 10^7$ LXS/hAng-2-Viren/ml ebenfalls nur einen geringen Teil der Netzhaut infizieren und relativ wenig Angiopoietin-2 exprimieren können. Daher war bereits aufgrund der LXS/PLAP-Experimente zumindest kein großer Effekt auf den Perizytenbesatz zu erwarten. Bei einer Infektionsfläche von etwa 1/35 der gesamten Netzhaut ist es zudem schwierig, in den quantitativen Auswertungen des Perizytenbesatzes gerade diesen Bereich der Angiopoietin-2 Expression zu erfassen. Durch Mitteln der Daten mit Werten aus den restlichen nichtinfizierten 34/35 der Fläche gehen etwaige Effekte verloren. Für diese Überlegung spricht auch die höhere Standardabweichung in der LXS/hAng-2-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist ein indirekter Hinweis auf Bereiche der Netzhaut, in denen der Perizytenbesatz durchaus vermindert, aus besagten Gründen statistisch jedoch schlecht erfassbar ist.

Nicht zu vergessen ist, dass die verwendeten Retroviren zur Infektion ruhender Zellen nur begrenzt fähig sind. So können vom *Moloney murine leukemia virus* (MoMLV) abgeleitete Retroviren aufgrund ihres Lebenszyklus nur proliferierende Zellen infizieren, da das Auflösen der Kernmembran Vorbedingung für den Eintritt des Virus-Core in den Zellkern ist. Die niedrige Zellteilungsrate innerhalb der Netzhaut wäre somit eine weitere Erklärung für den ausgebliebenen Perizytenverlust nach Infektion mit LXS/hAng-2-Viren. Zukünftige Studien könnten dieses Problem umgehen, indem Retroviren verwendet werden, die sich nicht vom *Moloney murine leukemia virus* ableiten, sondern auf Lentiviren (z.B. HIV) zurückgehen [Naldini et al. 1996]. Allerdings würden diese Experimente stärkere Sicherheitsmaßnahmen erfordern, da mit potentiell humanpathogenen Viren umgegangen wird.

Ausgeschlossen werden kann die Vermutung, das eingeschleuste humane Angiopoietin-2 habe in der Ratte bzw. in der Maus keine bioaktive Wirkung auf das artfremde Gewebe. In verschiedenen Studien konnte die Bioaktivität des humanen Angiopoietin-2 auf Nagerzellen eindeutig nachgewiesen werden.

4.5 Ausblick

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit vorgestellten retroviralen Vektoren zur qualitativen Expression heterologer Gene in der Netzhaut nach intravitrealer Injektion fähig sind. Aufgrund der Eigenart des Wirtsgewebes und der verwendeten Retroviren war es uns jedoch nicht möglich, ausreichend hohe Angiopoietin-2 Spiegel in der Netzhaut zu schaffen, um ein Perizytenabfall von den Netzhautkapillaren nachweisen zu können. In dieser Form ist das beschriebene Tiermodell zur Simulation eines frühen Stadiums der Diabetischen Retinopathie und der hierdurch möglichen Identifizierung potentieller Angiopoietin-2 Antagonisten noch unausgereift. In Zukunft könnte dieses Modell nach einigen Änderungen im Versuchsaufbau dennoch bei der Identifizierung neuer Therapieformen in der Diabetischen Retinopathie Verwendung finden. So wäre es denkbar, virale Konstrukte zu nutzen, die sich nicht vom Maus-Leukämie-Virus ableiten, sondern zu den Adeno- oder Lentiviren zählen. Dadurch würde sich die Infektionsrate und somit auch die Angiopoietin-2 Produktionsrate erhöhen lassen. Weiterhin liegt es nahe, die Lokalisation des Infektionsgebietes innerhalb der Netzhaut durch Koexpression von Angiopoietin-2 und einem Reporterprotein zu markieren. Hierdurch ließen sich die Effekte potentieller Angiopoietin-2 Antagonisten gezielter dokumentieren und so neue Therapieformen in der Diabetischen Retinopathie zum Wohle des Patienten ermitteln.

5. Zusammenfassung

Die Mikroangiopathie des Diabetikers ist Folge einer exzessiven, chronischen Hyperglykämie und manifestiert sich im Auge als Diabetische Retinopathie, die zur Erblindung des Patienten führen kann. Kennzeichnend für diese Erkrankung ist eine Instabilisierung des Gefäßendothels der Netzhautkapillaren, was sich in Mikroaneurysmen, Netzhautblutungen oder Neovaskularisation der Retina widerspiegelt. Zu Beginn der Erkrankung ist die beschriebene Instabilisierung allein durch einen verminderten Perizytenbesatz gekennzeichnet. Perizyten sitzen den Kapillarwänden auf und stabilisieren das Gefäßsystem. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Angiopoietin-2 zu Perizytenverlust in der Netzhaut führt. Daher wäre das Verhindern des Perizytenabfalls durch Antagonisierung von Angiopoietin-2 ein denkbarer Weg, die Diabetische Retinopathie zu einem frühen Zeitpunkt zu therapieren. Unser Ziel war es, zur Identifizierung geeigneter Antagonisten ein Tiermodell zu schaffen, dessen Netzhautkapillaren sich im Stadium des Angiopoietin-2 vermittelten Perizytenabfalls befinden. Um diese Situation (das Frühstadium der Diabetischen Retinopathie) exakt zu simulieren, wird Angiopoietin-2 in das Auge eingebracht. Hierfür eignet sich besonders die Einschleusung der Angiopoietin-2 cDNA mittels retroviraler Vektoren, da deren DNA-Sequenzen in das Genom der Wirtszellen eingebaut wird und so eine stete Proteinexpression gewährleistet ist. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Klonierung retroviraler Vektor-Plasmide, die neben Angiopoietin-2 auch die Sequenz der alkalischen Phosphatase der Plazenta als Reporterprotein tragen. Es gelang weiterhin, infektiöse Viren zu synthetisieren und mit Hilfe des Reporterkonstrukts die Funktionalität dieser Viren *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen. Dabei wurde deutlich, daß die Methode der intravitrealen Injektion zur Infektion der Netzhautzellen erfolgreich angewendet werden kann. Die Expression des xenogenen Angiopoietin-2 in infizierten Zellen war ebenfalls eindeutig zu belegen. Zur Induktion des Angiopoietin-2 vermittelten Perizytenabfalls wurden die Viren nun in zwei verschiedene Tiermodelle injiziert und anschließend der Perizytenbesatz analysiert. Die infizierten Netzhäute beider Modelle zeigten jedoch keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen. Dies ist wahrscheinlich mit einer zu geringen Angiopoietin-2 Konzentration in der Netzhaut zu erklären, da die Infektionsrate der Netzhautzellen sehr gering war. In der jetzigen Form ist das beschriebene Modell zwar funktionstüchtig, aber noch unausgereift. Durch Verwendung von Angiopoietin-2 exprimierenden Adeno- oder Lentiviren würde sich die Infektionsrate und somit auch die Angiopoietin-2 Produktionsrate erhöhen lassen, um so therapeutisch nutzbare Angiopoietin-2 Antagonisten identifizieren zu können.

Abstract

People suffering from chronic hyperglycaemia in many cases develop an ocular microvascular disease called diabetic retinopathy, which is responsible for blindness among those patients. Inside the retina, an early sign of diabetic retinopathy is a destabilisation of the vascular endothelium, resulting in microaneurysms, haemorrhage or neovascularisation. Initially the destabilised vasculature often shows pericyte dropout, which reflects a reduction of vessel-stabilising pericytes within a vascular network. Recently it became obvious that angiopoietin-2 can induce pericyte dropout. Therefore early therapeutic inhibition of angiopoietin-2 could prevent pericyte loss and the development of severe diabetic retinopathy. To detect potential angiopoietin-2 antagonists, we intended to create an animal-model, whose retinal capillaries are exactly in the early pathologic situation of angiopoietin-2 mediated pericyte-dropout. To obtain this early state of diabetic retinopathy, angiopoietin-2 has to be expressed within the eye of the animals. A suitable way for the expression of angiopoietin-2 in the eye is the use of retroviral vectors encoding for angiopoietin-2, because after infection, the angiopoietin-2 gene is integrated into the cellular genome and continuously expressed in the retina. Therefore we cloned retroviruses carrying the transgenic angiopoietin-2 cDNA but we also generated a retroviral vector carrying the alkaline phosphatase of the placenta as a reporter gene. We were able to generate infectious viruses and to show their ability to express the transgene *in vitro* and *in vivo*. It became obvious that intravitreal injection of the retroviruses is practicable and suitable for infecting retinal tissue. For the induction of pericyte dropout, the retroviral vectors were injected into the animals and the pericyte coverage of the retinal vessels were analysed. To our surprise, no difference was seen in the pericyte number comparing treated animals with the control animals. It is likely that the angiopoietin-2 expression in the retina was too low, because only a few retinal cells were infected by the retroviruses. So the described animal-model is basically functional but could be improved using adeno- or lentiviruses which guaranty a more efficient infection of the retina and therefore a higher level of expressed protein.

6. Literaturverzeichnis

Aiello, P.L., Pierce, E.A., Foley, E.D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., Ferrara, N., King, G.L., Smith, L.E.H. (1995): Suppression of retinal neovascularisation in vivo by inhibiting of vascular endothelium growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** 10457-10461.

Asahara, T., Chen, D.H., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G.D. und Isner, J.M. (1998): *Tie-2* receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation Research* **83**, 233-40.

Assero, G., Lupo, G., Anfuso, C.D., Ragusa, N., Alberghina, M. (2001): High glucose and advanced glycation end products induce phospholipid hydrolysis and phospholipid enzyme inhibition in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Acta* **1533** 128-140.

Audero, E., Cascone, I., Maniero, F., Napione, L., Arese, M., Lanfranccone, L., Bussolino, F. (2004): Adaptor ShcA protein binds tyrosine kinase Tie2 receptor and regulates migration and sprouting but not survival of endothelial cells. *J Bio Chem.* **279** (13), 13224-13233.

Bennett, J., Wilson, J., Sun, D., Forbes, B., Maguire, A. (1994): Adenovirus Vector-Mediated In Vivo Gene Transfer Into Adult Murine Retina. *Invest. Ophthalm. Vis. Science* **35** (5) 2535-2542.

Benjamin, L.E., Hemo, I., Keshet, E. (1998): A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125** 1591-1598.

Berse, B., Brown, L.F., Van de Water, L., Dovrak, H.F., Senger, D.R. (1992): *Mol. Biol. Cell* **3** 211-220.

Brownlee, M. (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414** 813-820.

Burri, P.H., Tarek, M.R. (1990): A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anatomical recordings* **228** 35-45.

Cai, M., Zhang, H., Hui, R. (2003) :Single chain Fv antibody against angiopoietin-2 inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* **309** (4) 946-951.

Carmeliet, P. und Collen, , D. (1999): Role of vascularendothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Vascular Growth Factors and Angiogenesis.* 133-158

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gerstenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. und Nagy, A. (1996): Abnormal Blood Vessel Development And Lethality In Embryos Lacking A Single VEGF Allele. *Nature* **380**, 435-39.

- Chen, Y.Q. et al. (1998): Sp 1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273** 8225-8231.
- Chowers, I., Banin, E., Hemo, Y., Porat, R., Falk, H., Keshet, E., Pe'ér, J., Panet, A. (2001): Gene transfer by viral vectors into blood vessels in a rat model of retinopathy of prematurity. *Br. J. Ophthalmol.* **85** (8) 891-892.
- Chung NA, Makin AJ, Lip GY. (2003): Measurement of the soluble angiopoietin receptor tie-2 in patients with coronary artery disease: development and application of an immunoassay. *Eur J Clin Invest.* **33** (7) 529-35.
- Collins, T., Ginsburg, D., Boss, J.M., Orkin, S.H., Pober, J.S. (1985): Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* **316** 748-750.
- Conolly, D.T., Olander, J.V., Heuvelmand, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B.L., Leimgruber, R., Feder, J. (1992): *Mol. Biol. Cell* **2** 211-220.
- Coffin, J.M., Varmus, H.E. (1996): Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Cogan, D.G., Toussaint, D., Kuwabara, T. (1961): Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* **66** 366-378.
- Cooke, J.P., Rossitch, E., Jr., Andon, N.A., Loscalzo, J. und Dzau, V.J. (1991): Flow activates an endothelium potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *Journal of Clinical investigation* **88**, 1663-71.
- Davis, S., Papadopoulos, N., Alrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Huang, T., Kovac, L., Xu, A., Leidich, R., Radziejewska, E., Rafique, A., Goldberg, J., Jain, V., Bailey, K., Karow, M., Fandl, J., Samuelsson, S.J., Loffe, E., Rudge, J.S., Daly, T.J., Radziejewski, C. and Yancopoulos, G.D. (2003): Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nature structural biology* **1** (10) 38-44.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C. und Yancopoulos, G.D. (1996): Isolation of a angiopoietin-1, a ligand for the *Tie-2* receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-9.
- De Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. und Williams, L.T. (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelium growth factor. *Science* **255**, 989-91.
- Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1998): Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol. Biol.* **44** 1139-1145.
- Dodge, A.B., D'Amore, P.D. (1992): Cell-cell interactions in diabetic retinopathy. *Diabetics Care* **15** 1168-1180.

- Dorrell, M.I., Aguilar, E., Friedlander, M. (2002): Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43** (11) 3500-10.
- Du, X. L. et al. (2000): Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp 1 glycosylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97** 12222-12226.
- Dumont, D.J., Yamaguchi, T.P., Conlon, R.A., Rossant, J. und Breitman, M.L. (1992): tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**, 1471-80.
- Dumont, D.J., Gradwohl, G., Fong, G.H., Puri, M.C., Gertsenstein, M., Auerbach, A., und Breitman, M.L. (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosin kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes & Development* **8**, 1897-909.
- Enge, M., Bjarnegard, M., Gerhardt, H., Gustafsson, E., Kalen, M., Asker, N., Hammes, H.P., Shani, M., Fässler, R., Betsholtz, C. (2002): Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO-Journal* **21**/16 4307-4316.
- Engerman RL, Kern TS. (1984): Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes* **33** (1) 97-100.
- Engerman, R.L. (1989): Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* **38** 1203-1206.
- Esmon, C.T. (1993): Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. *Annual Review of Cell Biology* **9**, 1-26.
- Esmon, C.T. und Owen, W.G. (1981): Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 2249-52.
- Etho, T., Inoue, H., Tanaka, S., Barnard, G.F., Kitano, S., Mori, M. (2001): Angiopoietin-2 Is Related to Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinoma: Possible *in Vivo* Regulation via Induction of Proteases. *Cancer Research* **61** 2145-2153.
- Ferrara, N., Cavermoore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J. und Moore, M.W. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF. *Nature* **380**, 439-442.
- Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L.B., Leung, D.W. (1992): *Endocr. Rev.* **13** 18-32.
- Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J.M., Kritz, W., Thurston, G., Augustin, H.G. (2004): The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* Feb 19
- Fire, A., Harrison, S.W., Dixon, D.A. (1990): Modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **93** 189-198.

- Fruttiger, M. (2002): Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43** (2) 522-7.
- Gale, N.W., Thurston, G., Hackett, S.F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M.H., Jackson, D., Suri, C., Campochiaro, P.A., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D. (2002): Angiopoietin-2 is required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1. *Developmental Cell* **3** 411-423.
- Gariano, R.F. (2003): Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog. Ret. Eye Res.* (22) 3 295-306.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C. (2003): VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161** (6) 1163-74.
- Ginsberg, H.N. (2000): Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* **106** 453-458.
- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S. und Augustin, H.G. (1998): Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Laboratory Investigation* **78**, 1385-94.
- Graves, R.A., Tontonoz, P., Ross, S.R., Spiegelman, B.M. (1991): Identification of adipocyte-specific enhancer-involvement of NF-1 like factor. *Genes & Development* **5** 428-437.
- Hackett, S.F., Ozaki, H., Strauss, R.W., Wahlin, K., Suri, C., Maisonpierre, P., Yancopoulos, G., Campochiaro, P.A. (2000): Angiopoietin-2 expression in the retina: Upregulation during physiologic and pathologic neovascularisation. *Journal of Cellular Physiology* **184** 275-284.
- Hackett, S.F., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G., Campochiaro, P.A. (2002): Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology* **192** 182-187.
- Haitoglou, C.S., Tsilibary, E.C., Brownlee, M., Charonis, A.S. (1992): Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J. Biol. Chem.* **267** 12404-12407.
- Hammes, H.P. et al. (1991): Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88** 11555-11559.
- Hammes, H.P., Jihong, L., Renner, O., Shani, M., Lundqvist, A., Betsholtz, C., Brownlee, M., Deutsch, U. (2002): Pericytes and the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **51** 3107-3112.
- Hammes, H.P. (2003): Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J. Diabetes Complications*. **17** 16-19.
- Hammes, H.P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q.L.J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giardino, I., Brownlee, M. (2003): Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycaemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature med.* **9** 294-299.

Hammes, H.P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., vom Hagen, F., Krzizok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M., Deutsch, U. (2004): Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* eingereicht

Hayes, A.J., Huang, W.Q., Mallah, J., Yang, D.J., Lippman, M.E., Li, Y. (1999): Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvascular Research* **58** 224-237.

Heldin, C.H. (1992): Structural and functional studies on platelet-derived growth factor *EMBO Journal* **11** 4251- 4259.

Hellström, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., Betsholtz, C. (2001): Lack of Pericytes leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **153** 543-553.

Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., Betsholtz, C. (1999): Role of PDGF-B and PDGFR-b in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126** 3047-3055.

Hempel, A. et al. (1997): High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ. Res.* **81** 363-371.

Hertig, A.T. (1935): Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst. Washington* **25**, 37-81.

Holash, J., Wiegand, S.J. und Yancopoulos, G.D. (1999): New model of tumor-angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* **18**, 5356-62.

Hu B, Guo P, Fang Q, Tao HQ, Wang D, Nagane M, Huang HJ, Gunji Y, Nishikawa R, Alitalo K, Cavenee WK, Cheng SY. (2003): Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (15) 8904-8909.

Huijberts, M.S.P. et al. (1993): Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J. Clin. Invest.* **92** 1407-1411.

Jeffers, M., Taylor, G.A., Weidner, K.M., Omura, S., Vande Woude, G.F. (1997): Degradation of Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell. Biol.* **17** 799-808.

Jones, N., Chen, S.H., Sturk, C., Master, Z., Tran, J., Kerbel, R.S., Dumont, D.J. (2003): A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol Cell Biol.* **23** (8), 2658-2668.

Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K. (1996): A novel vascular endothelium growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO Journal* **15**, 290-98.

- Ishii, H. et al. (1996): Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* **272** 728-731.
- Joussen, A.M., Poulaki, V., Tsujikawa, A., Qin, W., Qaum, T., Xu, Q., Moromizato, Y., Bursell, S.E., Wiegand, S.J., Rudge, J., Loffe, E., Yancopoulos, G.D., Adamis, A.P. (2002): Suppression of Diabetic Retinopathy with Angiopoietin-1. *American Journal of Pathology* **160** 1683-1693.
- Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J., Tjian, R. (1988): Distinct regions of Sp 1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242** 1566-1570.
- Kador PF, Akagi Y, Terubayashi H, Wyman M, Kinoshita JH. (1988): Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries of galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol.* **106** (8) 1099-1102.
- Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M, Koh GY. (2000): Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **16** 269 (2) 361-5.
- Kim, I., Kim, J.H., Ryu, Y.S., Jung, S.H., Nah, J.J., Koh, G.Y. (2000): Characterization and Expression of a Novel Alternatively Spliced Human Angiopoietin-2. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (24) 18550-18556.
- Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L. (1984): The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* **102** 520-532.
- Koblizek, T.I., Weiss, C., Yancopoulos, G.D., Deutsch, U. und Risau, W. (1998): Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis *in vitro*. *Current Biology* **8**, 529-32.
- Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R., Schleicher, E.D. (1998): High glucose induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.* **101** 160-169.
- Koya, D., King, G.L. (1998): Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* **47** 859-866.
- Kowluru RA, Tang J, Kern TS. (2001): Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* **50** (8) 1938-1942.
- Krikun, G., Schatz, F., Finlay, T., Kadener, S., Mesia, A., Gerrets, R., Lockwood, C.J. (2000): Expression of Angiopoietin-2 by Human Endometrial Endothelial Cells: Regulation by Hypoxia and Inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **275** 159-163.
- Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., Alitalo, K. (1996): VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* **122** 3829-3837.
- Kwak, H.J., So, J.N., Lee, S.J., Kim, I., Koh, G.Y. (1999): Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Letters* **448** 249-253.

- Lee, H.J., Koh, G.Y. (2003): Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochem biophys res Commun.* **304** (2), 399-404.
- Lindahl, P., Johansson, B.R., Leveen, P., Betsholtz, C. (1997): Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science* **277** 242-245.
- Lobov, I.B., Brooks, P.C., Lang, R.A. (2002): Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *PNAS* **99** 11205-11210.
- Lu, M. et al. (1998): Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelium growth factor expression. *J. Clinical Investigation* **101** 1219-1224.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J. Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N. und Yancopoulos, G.D. (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for *Tie-2* that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* **277**, 55-60.
- Markowitz, D., Goff, S., Bank, A. (1988): Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virol.* **167** 400-406.
- Markowitz, D., Goff, S., Bank, A. (1988): A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **62** 1120-1124.
- Marron, M.B., Hughes, D.P., Edge, M.D., Forder, C.L., Brindle, N.P.J. (2000): Evidence for Heterotypic Interaction between the Receptor Tyrosine Kinases TIE-1 and TIE-2. *Journal of Biological Chemistry* **275** 39741-39746.
- Master, Z., Jones, N., Tran, J., Jones, J., Kerbel, R.S., Dumont, D.J. (2001): Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO Journal* **20** 5919-5928.
- Mezquita J, Mezquita P, Montserrat P, Mezquita B, Francone V, Vilagrasa X, Mezquita C (2000): Genomic structure and alternative splicing of chicken angiopoietin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* **275** (2) 643-651.
- Miyazato, M., Fukuda, M., Iwamasa, T. (1991): Growth characteristics of retinal capillary endothelial cells compared with pulmonary vein endothelial cells in culture. *Acta Pathologica Japonica* **41** 133-142.
- Millauer, B., Wизigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Møller, N.P.H., Risau, W. und Ullrich, A. (1993): High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**, 835-846.
- Miller, A.D., Buttimore, C. (1986): Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol.* **6** (8) 2895-902.
- Miller, A.D., Buttimore, C. (1986): Factors involved in production of helper virus-free retrovirus vectors. *Somat Cell Mol Genet.* **12** (2) 175-83.

- Moss, S.E., Klein, R., Klein, B.E. (1988): The incidence of vision loss in adiabetic population. *Ophthalmology* **95** 1340-1348.
- Mudhar, H.S., Pollok, R.A., Wang, C., Stiles, C.D., Richardson, W.D. (1993): PDGF and ist receptors in the developing rodent retina and optic nerve. *Development* **118** 539-552.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D. (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of non-deviding cells by a lentiviral vector. *Science* **272** 263-267.
- Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D., Verma, I.M. (1996): Efficient transfer, integration and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 11382-11388.
- Nehls, V., Denzer, K., Drenckhahn, D. (1992): Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* **270** 469-474.
- Nehls, V., Drenckhahn, D. (1991): Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *Journal of Cell Biology* **113** 147-154.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. und Poltorak, Z. (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ist receptors. *FASEB Journal* **13**, 9-22.
- Nikosia, R.F., Villaschi, S. (1995): Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab. Invest.* **73** 658-666.
- Nishikawa, T. et al. (2000): Normalising mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404** 787-790.
- Niu, Q., Perruzzi, C., Voskas, D., Lawler, J., Dumont, D.J., Benjamin, L.E. (2004): Inhibition of Tie-2 signaling induces endothelial cell apoptosis, decreases akt signaling, and induces endothelial cell expression of the endogenous anti-angiogenic molecule, thrombospondin-1. *Cancer Biol Ther.* **3** (4), 402-405.
- Niu, X.L., Peters, K.G., Kontos, C.D. (2002): Deletion of the carboxyl terminus of Tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism. *J Biol Chem.* **277** (35), 31768-73.
- Oh, H., Takagi, H., Suzuma, K., Otani, A., Matsumuta, M., Honda, Y. (1999): Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively upregulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **274** 15732-15739.
- Ohno-Matsui, K., Hirose, A., Yamamoto, S., Saikia, J., Okamoto, Gehlbach, P., Duh, E.J., Hackett, S., Chang, M., Bok, D., Zack, D.J., Campochiaro, P.A. (2002): Inducible Expression of Vascular Endothelial Growth Faktor in Adult Mice Causes Severe Proliferative Retinopathy and Retinal Detachment. *American Journal of Pathology* **160** 711-719.
- Okamoto, N., Tobe, T., Hackett, S.F., Ozaki, H., Viores, M.A., LaRochelle, W., Zack, D.J., Campochiaro, P.A. (1997): Transgenic mice with increased expression of vascular endothelium growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularisation *Am. J. Pathology* **151** 281-291.

- Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Koga K, Abe R, Takeuchi M, Ohno S, Yoshimura A, Makita Z. (2002): Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *FASEB J.* **16** (14) 1928-30.
- Orlidge, A. Dámore, P.A. (1987): Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology* **105** 1455-1462.
- Park, Y.S., Kim, N.H., Jo, I. (2003): Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie-2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc. Res.* **65** 125-31.
- Patan, S., Munn, L.L. und Jain, R.K. (1996): Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma Xenograft-a novel mechanism of tumor-angiogenesis. *Microvascular Research* **51**, 260-72.
- Patan, S. (1998): TIE1 and TIE2 receptor tyrosin kinase inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvascular Research* **56** 1-21
- Peters, K.G., Coogan, A., Berry, D., Marks, J., Iglehart, J.D., Kontos, C.D., Rao, P., Sankar, S. und Trogan, E. (1998): Expression Of Tie-2/TEK In Breast Tumor Vasculature Provides A New Marker For Evaluation Of Tumor Angiogenesis. *British Journal of Cancer* **77**, 51-56.
- Peters, K.G., Kontos, C.D., Lin, P.C., Wong, A.L., Rao, P., Huang, L., Dewhirst, M.W., Sankar, S. (2004): Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res.* **59**, 51-71.
- Pierce, E.A., Avery, R.L., Foley, E.D., Aiello, L.P., Smith, L.E.H. (1995): Vascular endothelium growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** 905-909.
- Portilla, D. et al. (2000): Etomoxir-induced PPAR alpha modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278** F667-F675.
- Procopio, W.N., Pelavin, P.I., Lee, W.M.F., Yeilding, N.M. (1999): angiopoietin-1 and -2 Coiled Coil Domains Mediate Distinct Homo-oligomerization Patterns, but Fibrinogen-like Domains Mediate Ligand Activity. *J. Biological Chemistry* **274** 30196-30201.
- Puri, M.C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., Partanen, J. (1995): The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO Journal* **14** 5884.
- Reusch, P., Barleon, B., Weindel, K., Martiny-Baron, G., Gödde, A., Siemeister, G., Marme, D. (2001): Identification of a soluble form of the angiopoietin receptor TIE-2 released from endothelial cells and present in human blood. *Angiogenesis* **4** 123-131.
- Risau, W. und Flamme, I. (1991): Vasculogenesis. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* **11**, 73-91.
- Risau, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671.

Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. (2002): Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* **51** (7) 2241-2248.

Rous, P. (1910): A transmissible avian neoplasm sarcoma of the common fowl. *Clin Orthop.* **289** (1993) 3-8.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-7.

Sasaki, M, Wizigmann-Voss, S., Risau, W., Plate, K.H. (1999): Retrovirus producer cells encoding antisense VEGF prolong survival of rats with intracranial GS9L glioma. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17** 579-591.

Sato, Y., Rifkin, D.B. (1989): Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth faktor- β 1-like moleküle by plasmin during co-culture. *Journal of Cell Biology* **109** 309-315.

Sato, T.N., Qin, Y., Kozak, C.A., Audus, K.L. (1993): Tie-1 and Tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 9355-9358.

Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg, B.K., Fujiwara, Y., Gendron, M.M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. und Qin, Y. (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-4.

Schläger, T.M. (1998): Identifikation und Analyse genregulatorischer Elemente des endothelzellspezifischen Tie2-Gens sowie deren Anwendung zur Etablierung konditioneller Genexpressionssysteme in transgenen Mäusen. Phillips-Universität Marburg, pp. 147.

Schlessinger, J., Ullrich, A. (1992): Growth factor signaling by receptor tyrosin kinases. *Neuron* **9** 383-391.

Schor, A.M., Schor, S.L. (1986): The isolation and culture of endothelial cells and pericytes from the bovine retinal microvasculature: a comparative study with large vessel vascular cells. *Microvascular Research* **32** 21-38.

Schnürch, H. und Risau, W. (1993): Expression of Tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* **119**, 957-68.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gerstenstein, M., Wu, X.F., Breitman, L. und Schuh, A.C. (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* **376**, 62-66.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E. (1992): Vascular endothelium growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359** 843-845.

Sims, D.E. (1986): The pericyte-A review. *Tissue Cell* **18** 153-174.

Speiser, P., Gittelsohn, A.M., Patz, A. (1968): Studies on diabetic retinopathy. III Influence of diabetes on intramural pericytes. *Arch. Ophthalmol.* **80** 332-337.

Spurbeck W.W., Ng, C.Y., Vanin, E.F., Davidoff, A.M. (2003): Retroviral vector-producer cell-mediated in vivo gene transfer of TIMP-3 restricts angiogenesis and neuroblastoma growth in mice. *Cancer Gene Ther.* **10** (3) 161-167.

Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, D'Amore PA. (2002): Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest.* **109** (3) 327-336.

Stitt, A.W. et al. (1997): Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am. J. Pathol.* **150** 523-528.

Stoeltzing, O., Ahmad, S.A., Liu, W., McCarty, M.F., Wey, J.S., Parikh, A.A., Fan, F., Reinmuth, N., Kawaguchi, M., Bucana, C.D., Ellis, L.M. (2003): Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res.* **63** 3370-7.

Stratmann, A., Risau, W., Plate, K.H. (1998): Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **153** 1459-1466.

Sundberg C, Ljungstrom M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K. (1993): Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol.* **143** (5), 1377-88.

Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D. (1996): Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the *Tie-2* receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-80.

Takaga, H., Koyama, S., Seike, H., Oh, H., Matsumura, M., Honda, Y. (2003): Potential role of the angiopoietin/tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularisation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44** 393-402.

Takahama, M., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Nezu, K., Kushibe, K., Taniguchi, S., Kotake, Y. und Konishi, Y. (1999): Enhanced expression of *Tie-2*, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas. *Clinical Cancer Research* **5**, 2506-10.

Teichert-Kuliszewska, K., Maisonpierre, P.C., Jones, N., Campbell, A.I.M., Master, Z., Bendeck, M.P., Alitalo, K., Dumont, D.J., Yancopoulos, G.D., Stewart, D.J. (2000): Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovascular Research* **49** 659-670.

- Temin, H.M., Mituzami, S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Biotechnology* **24** 51-56.
- Terman, B.I., Doughter-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D. und Bohlen, P. (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **187**, 1579-86.
- Thornalley, P.J. (1990): The glyoxalase system: new developments towards functional characterisation of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* **269** 1-11.
- Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., McDonald, D.M. (1999): Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286** 2511-2515.
- Thurston, G., Rudge, J.S., Loffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D.M., Yancopoulos, G.D. (2000): Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature Medicine* **6** 460-463.
- Tidhar, A., Reichenstein, M., Cohen, D., Faerman, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Shani, M. (2001): A novel Transgenic Marker for Migrating Limb Muscle Precursors and for Vascular Smooth Muscle Cells. *Developmental Dynamics* **220** (60-73)
- Tsiamis, A.C., Morris, P.N., Marron, M.B., Brindle, N.P.J. (2002): Vascular Endothelial Growth Factor Modulates the TIE-2:TIE-1 Receptor Complex. *Microvascular Research* **63** 149-158.
- Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G., Nishikawa, S.I. (2002): Recombinant Angiopoietin-1 restores high-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *Journal of Clinical Investigation* **110** 1619-1628.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998): Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. (UKPDS 33). *Lancet* 352 837-853.
- Valenzuela, D.M., Griffiths, J.J., Rojas, J., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Zhou, H., McClain, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Huang, T., Papadopoulos, N., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Yancopoulos, G.D. (1999): Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans. *PNAS* **96** 1904-1909.
- Vecchi, M., Baulida, J., Carpenter, G. (1996): Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *Journal of Biological Chemistry* **271** 18989-18995.
- Veikkola, T., Alitalo, K. (2002): Dual role of Angiopoietin-2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Developmental Cell* **3** (3) 302-304.
- Von Schulte, W. (1914): Early stages of vasculogenesis in the cat (*Felis domestica*) with special reference to the mesenchymal origin of endothelium. *Anatomical Record* **8**, 78-80.

Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. und Heldin, C.H. (1994): Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 26988-95.

Wells-Knecht, K.J. et al. (1995): Mechanism of autooxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autooxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* **34** 3702-3709.

White, R.R., Shan, S., Rusconi, C.P., Shetty, G., Dewhirst, M.W., Kontos, C.D. and Sullenger, B.A. (2003): Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *PNAS* **100** (9), 5028-5033.

Williamson, J.R. et al. (1993): Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* **42** 801-813.

Wong, A.L., Haroon, Z.A., Werner, S., Dewhirst, M.W., Greenberg, C.S. und Peters, K.G. (1997): *Tie-2*, expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circulation Research* **81**, 567-74.

Yabkowitz, R., Meyer, S., Black, T. et al. (1999): Inflammatory cytokines and vascular endothelium growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation. *Blood* **93** 1969-1979.

Yamagishi, S.S., Amano, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Koga, K., Sasaki, N., Yamamoto, H., Takeuchi, M., Makita, Z. (2002): Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290** 973-978.

Yuan, H.T., Yang, S.P., Woolf, A.S. (2000): Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells. *Kidney International* **58** 1912-1919.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
βME	2-Mercaptoethanol
Bp	Basenpaare
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFU	<i>Colony forming unit</i> (= Viruspartikel)
DAG	1,2-Diacylglycerin
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxy-(Adenosin-Thymosin/Guanosin/Cytidin-) triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E13	Embryonaler Tag 13
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	Doppelt destilliertes Wasser
kB	Kilobasenpaare
kDa	10 ³ Dalton
Lsg.	Lösung
m	Meter
MetOH	Methanol
min	Minute(n)
mRNA	Botenribonukleinsäure
OD _N	Optische Dichte bei N nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

r	Radius
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SV40	<i>simian vacuolating virus 40</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TG	Transgen
<i>TIE</i>	<i>tyrosine kinase with immunoglobuline- and epidermal growth factor homology domains</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
ÜN	über Nacht (12-16 h)
VEGF	Vasculoendothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel

7.2 Bildnachweis

Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen stammen, wenn nicht anders in der Bildunterschrift erwähnt, vom Autor.

7.3 Sequenz des retroviralen Expressionsvektors pLXSN (5.87 kB)

```

TTTGAAAGAC CCCACCCGTA GGTGGCAAGC TAGCTTAAGT AACGCCACTT TGCAAGGCAT
GGAAAAATAC ATAAGTGAAG ATAGAAAAGT TCAGATCAAG GTCAGGAACA AAGAAACAGC
TGAATACCAA ACAGGATATC TGTGGTAAGC GGTTCCTGCC CCGGCTCAGG GCCAAGAACA
GATGAGACAG CTGAGTGATG GGCCAAACAG GATATCTGTG GTAAGCAGTT CCTGCCCCGG
CTCGGGGCCA AGAACAGATG GTCCCCAGAT GCGGTCCAGC CCTCAGCAGT TTCTAGTGAA
TCATCAGATG TTTCCAGGGT GCCCCAAGGA CCTGAAAATG ACCCTGTACC TTATTTGAAC
TAACCAATCA GTTCGCTTCT CGCTTCTGTT CGCGCGCTTC CGCTCTCCGA GCTCAATAAA
AGAGCCCACA ACCCCTCACT CGGCGCGCCA GTCTTCCGAT AGACTGCGTC GCCCGGGTAC
CCGTATTCCC AATAAAGCCT CTTGCTGTTT GCATCCGAAT CGTGGTCTCG CTGTTCTTTG
GGAGGGTCTC CTCTGAGTGA TTGACTACCC ACGACGGGGG TCTTTCATTT GGGGGCTCGT
CCGGGATTTG GAGACCCCTG CCCAGGGACC ACCGACCCAC CACCGGGAGG TAAGCTGGCC
AGCAACTTAT CTGTGTCTGT CCGATTGTCT AGTGTCATATG TTTGATGTTA TGCGCCTGCG
TCTGTACTAG TTAGCTAAGT AGCTCTGTAT CTGGCGGACC CGTGGTGGA CTGACGAGTT
CTGAACACCC GGCCGCAACC CTGGGAGACG TCCCAGGGAC TTTGGGGGCC GTTTTTGTGG
CCCGACCTGA GGAAGGGAGT CGATGTGGAA TCCGACCCCG TCAGGATATG TGGTCTGTGT
AGGAGACGAG AACCTAAAC AGTTCCCGCC TCCGTCTGAA TTTTGTGCTT CGGTTTGGA
CCGAAGCCGC GCGTCTTGTC TGCTGCAGCG CTGCAGCATC GTTCTGTGTT GTCTCTGTCT
GACTGTGTTT CTGTATTTGT CTGAAAATTA GGGCCAGACT GTTACCACTC CCTTAAGTTT
GACCTTAGGT CACTGGAAAG ATGTCGAGCG GATCGCTCAC AACCAGTCGG TAGATGTCAA
GAAGAGACGT TGGGTTACCT TCTGCTCTGC AGAATGGCCA ACCTTTAACG TCGGATGGCC

GCGAGACGGC ACCTTTAACC GAGACCTCAT CACCCAGGTT AAGATCAAGG TCTTTTCACC
TGGCCCGCAT GGACACCCAG ACCAGGTCCC CTACATCGTG ACCTGGGAAG CCTTGGCTTT
TGACCCCCCT CCCTGGGTCA AGCCCTTTGT ACACCTAAG CCTCCGCTC CTCTTCTCC
ATCCGCCCCG TCTCTCCCC TTGAACCTCC TCGTTCGACC CCGCCTCGAT CCTCCCTTTA
TCCAGCCCTC ACTCCTTCTC TAGGCGCCGG AATTTCGTTA CTCGAGGATC CGGCTGTGGA
ATGTGTGTCA GTTAGGGTGT GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA
GCATGCATCA CAATTAGTCA GCAACCAGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA
GAATGATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAT AGTCCCCGCC CTAATCCGC
CCATCCCGCC CTAACCTCCG CCCAGTTCGG CCCATTCTCC GCCCATGGC TGACTAATTT
TTTTTATTTA TGCAGAGGCC GAGGCCGCTC CGGCCTCTGA GCTATTCCAG AAGTAGTGAG
GAGGCTTTTT TGGAGGCCTA GGCTTTTGCA AAAAGCTTGG GCTGCAGGTC GAGGCGGATC
TGATCAAGAG ACAGGATGAG GATCGTTTCG CATGATTGAA CAAGATGGAT TGCACGCAGG
TTCTCCGGCC GCTTGGGTGG AGAGGCTATT CGGCTATGAC TGGGCACAAC AGACAATCGG
CTGCTCTGAT GCCGCCGTGT TCCGGCTGTC AGCGCAGGGG CGCCCGGTTT TTTTGTCAA
GACCGACCTG TCCGGTGCCC TGAATGAACT GCAGGACGAG GCAGCGCGGC TATCGTGGCT
GGCCACGACG GCGGTTTCCTT GCGCAGCTGT GCTCGACGTT GTCACCTGAAG CGGGAAGGGA
CTGGCTGCTA TTGGGCGAAG TGCCGGGGCA GGATCTCCTG TCATCTCACC TTGCTCCTGC
CGAGAAAGTA TCCATCATGG CTGATGCAAT GCGGCGGCTG CATACGCTTG ATCCGGCTAC
CTGCCCATTG GACCACCAAG CGAAACATCG CATCGAGCGA GCACGTACTC GGATGGAAGC
CGGTCTTGTC GATCAGGATG ATCTGGACGA AGAGCATCAG GGGCTCGCGC CAGCCGAAC

GTTCCGCCAG CTCAAGGCGC GCATGCCCCG CGGCGAGGAT CTCGTCTGTA CCCATGGCGA
TGCCTGCTTG CCGAATATCA TGGTGAAAAA TGGCCGCTTT TCTGGATTCA TCGACTGTGG
CCGGCTGGGT GTGGCGGACC GCTATCAGGA CATAGCGTTG GCTACCCGTG ATATTGCTGA
AGAGCTTGGC GGCGAATGGG CTGACCGCTT CCTCGTGCTT TACGGTATCG CCGCTCCCGA
TTCGACGCGC ATCGCCTTCT ATCGCCTTCT TGACGAGTTC TTCTGAGCGG GACTCTGGGG
TTCGATAAAA TAAAAGATTT TATTTAGTCT CCAGAAAAAG GGGGGAATGA AAGACCCAC
CTGTAGGTTT GGCAAGCTAG CTTAAGTAAC GCCATTTTGC AAGGCATGGA AAAATACATA
ACTGAGAATA GAGAAGTTCA GATCAAGGTC AGGAACAGAT GGAACAGCTG AATATGGGCC
AAACAGGATA TCTGTGGTAA GCAGTTCCTG CCCCAGCTCA GGGCCAAGAA CAGATGGAAC
AGCTGAATAT GGGCCAAACA GGATATCTGT GGTAAGCAGT TCCTGCCCCG GCTCAGGGCC
AAGAACAGAT GGTCCCCAGA TGCGGTCCAG CCCTCAGCAG TTTCTAGAGA ACCATCAGAT
GTTTCCAGGG TGCCCCAAGG ACCTGAAATG ACCCTGTGCC TTATTTGAAC TAACCAATCA
GTTGCTTCTT CGCTTCTGTT CGCGCGCTTC TGCTCCCCGA GCTCAATAAA AGAGCCACA
ACCCCTCACT CGGGGCGCCA GTCCTCCGAT TGACTGAGTC GCCCGGGTAC CCGTGTATCC
AATAAACCTT CTTGCAGTTG CATCCGACTT GTGGTCTCGC GTTTCCTTGG GAGGGTCTCC
TCTGAGTGAT TGACTACCCG TCAGCGGGGG TCTTTTCAATT GGGGGCTCGT CCGGGATCGG
GAGACCCCTG CCCAGGGACC ACCGACCCAC CACCGGGAGG TAAGCTGGCT GCCTCGCGCG

```

```

TTTCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG
GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGTATA CTGGCTTAAC

TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC
AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG CTTCTCTGCT CACTGACTCG
CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCTGAC
GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA
TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA TAGCTCACGC
TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC
CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA
GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT
ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC
ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA
TTTCGTTTCAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC
TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT

TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT GCAGGCATCG TGGTGTACAG CTCGTCGTTT
GGTATGGCTT CATTACAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTGAGAAG TAAGTTGGCC
GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ACACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA
ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA
CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG
GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTTCA ATATTATTGA
AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
AAACAAATAG GGGTTCGCGC CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAAACC
ATTATTATCA TGACATTAACT CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAA
GAATTGCTAG CAATTGCTAG CAATTGCTAG CAATTCATAC CAGATCACCG AAAACTGTCC
TCCAAATGTG TCCCCCTCAC ACTCCCAAAT TCGCGGGCTT CTGCCTCTTA GACCACTCTA
CCCTATTCCC CACACTCACC GGAGCCAAAG CCGCGGCCCT TCCGTTTCTT TGCT

```

Lokalisationen wichtiger Strukturelementes des retroviralen Vektorplasmids pLXSN:

Strukturelement von pLXSN	Basen
• 5' MoMuLV LTR:	1–589
• ψ^+ (extended packaging signal):	659–1468
• Multiple Cloning Site (MCS):	1470–1791
• Early SV40 promoter (P_{SV40e}):	1481–1846
• Neomycin resistance gene (Neo ^r):	Start codon: 1892–1894 Stop codon: 2684–2686
• 3' MoMuLV LTR:	2746–3339
• Col E1 origin of replication:	Site of replication initiation: 3875
• Ampicillin resistance gene:	Start codon: 5495–5493 Stop codon: 4637–4635

7.4 Lebenslauf

Von Patrick Wagner, geboren am 29.04.1974 in Friedberg/ Hessen

Schulbildung

- 1981 - 1984 **Besuch der „Grundschule am Solgraben“** in Bad Nauheim
- 1984 - 1993 **Besuch des „Ernst-Ludwig-Gymnasiums“** in Bad Nauheim
Abschluß: Abitur, Gesamtnote: 1,9

Wehrdienst

- 07/93 – 06/94 **Grundwehrdienst** in der Bundesmarine

Hochschulstudium

- 10/94 – 03/00 **Studium der Biologie** an der Justus-Liebig-Universität-Giessen
Abschluß: Diplom-Biologe (Dipl.-Biol.), Gesamtnote: sehr gut

Thema der Diplomarbeit:
Funktionelle Analyse endothelzellspezifischer Transkriptionskontroll-
elemente
- 10/98 – 11/04 **Studium der Medizin** an der Justus-Liebig-Universität Giessen und an der
Technischen Universität Dresden
Abschluß: Staatsexamen, Gesamtnote: gut (1,66)
- 07/00 – 08/04 **Promotion zum Dr. rer. nat.** am Max-Planck-Institut für Physiologische
und Klinische Forschung (Kerckhoff-Institut) Bad Nauheim, Abteilung
molekulare Zellbiologie, Note: magna cum laude

Thema der Dissertation:
Analyse der Wirkung von Angiopoietin-2 auf das Gefäßsystem der Netzhaut
in verschiedenen Tiermodellen
- 11/04 **Approbation als Arzt**

7.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans Peter Hammes danke ich für die freundliche Betreuung meiner Promotion. Die Dissertation wurde in der Abteilung für innere Medizin / Medizinische Klinik III des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut Bad Nauheim (Kerckhoff-Institut) angefertigt. Für die Betreuung in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie am Max-Planck-Institut Bad Nauheim danke ich Herrn Dr. Urban Deutsch. Weiterhin wäre ohne die nette Einweisung in die Methodik der enzymatischen Digestion durch Prof. Dr. Hans Peter Hammes und Dr. Jihong Lin diese Arbeit nicht durchzuführen gewesen. Für die freundlichen Hinweise bei den intravitrealen Injektionen danke ich Herrn PD Dr. Thomas Krzizok. Frau Sylvia Hennig danke ich für die Unterstützung bei der Laborarbeit. Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppen in Gießen und Bad Nauheim sei Dank für die nette Arbeitsatmosphäre und produktive Kooperation in den letzten Jahren. Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, die mir diese Ausbildung erst ermöglicht hat.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, den

(Patrick Wagner)